

SA Listney

02/18/00  
jc685 U.S. PTO

Patent  
Attorney's Docket No. 032751-027

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

REQUEST FOR FILING CONTINUATION/DIVISIONAL  
APPLICATION UNDER 37 C.F.R. § 1.53(b)

Box PATENT APPLICATION  
Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

jc542 U.S. PTO  
09/506942  
02/18/00

Sir:

This is a request for filing a [ ] continuation [X] divisional application under 37 C.F.R.  
§ 1.53(b) of pending Application No. 09/043,933 filed on March 3, 1998, for  
PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING PAPILLOMAVIRUS TUMORS AND  
INFECTION, by the following named inventor(s):

- (a) Full Name Jean-Marc BALLOUL
- (b) Full Name Nadine BIZOUARNE
- (c) Full Name Marie-Paule KIENY

[ ] The entire disclosure of the prior application from which a copy of the oath or declaration is  
supplied herewith is considered as being part of the disclosure of the accompanying  
application and is hereby incorporated by reference therein.

[ ] This application is being filed by less than all the inventors named in the prior application.  
In accordance with 37 C.F.R. 1.63(d)(2), the Commissioner is requested to delete the  
name(s) of the following person or persons who are not inventors of the invention being  
claimed in this application.

- (a) Full Name \_\_\_\_\_
- (b) Full Name \_\_\_\_\_
- (c) Full Name \_\_\_\_\_

[ ] This application is being filed by more than all the inventors named in the prior application.  
In accordance with 37 C.F.R. 1.63(d)(2), the Commissioner is requested to add the name(s)  
of the following person or persons who are inventors of the invention being claimed in this  
application.



21839

- (a) Full Name \_\_\_\_\_  
(b) Full Name \_\_\_\_\_  
(c) Full Name \_\_\_\_\_

1. ☒ Enclosed is a copy of the prior Application No. 09/043,933 as originally filed on March 30, 1998, including copies of the specification, claims, drawings and the executed oath or declaration as filed.
2. ☐ Enclosed is a revised prior application and a copy of the prior executed oath or declaration as filed. No new matter has been added to the revised application.
3. ☐ \_\_\_\_\_ statement(s) claiming small entity status ☐ are enclosed ☐ were filed in prior Application No. \_\_, filed on \_\_.
4. ☒ The filing fee is calculated below ☒ and in accordance with the enclosed preliminary amendment:

CLAIMS					
	NO. OF CLAIMS		EXTRA CLAIMS	RATE	FEE
Basic Application Fee					\$690.00 (101)
Total Claims	20	MINUS 20 =	0	x \$18.00 (103) =	0.00
Independent Claims	1	MINUS 3 =	0	x \$78.00 (102) =	0.00
If multiple dependent claims are presented, add \$260.00 (104)					0.00
Total Application Fee					690.00
If small entity status is claimed, subtract 50% of Total Application Fee					0.00
Add Assignment Recording Fee of if Assignment document is enclosed					0.00
<b>TOTAL APPLICATION FEE DUE</b>					<b>\$690.00</b>

5. ☐ Charge \$ \_\_\_\_\_ to Deposit Account No. 02-4800 for the fee due.

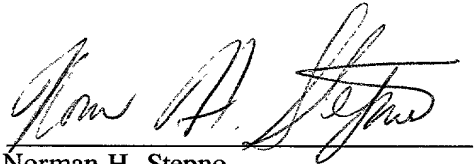
6. ☒ A check in the amount of \$ 690.00 is enclosed for the fee due.
7. ☒ The Commissioner is hereby authorized to charge any appropriate fees under 37 C.F.R. §§ 1.16, 1.17 and 1.21 that may be required by this paper, and to credit any overpayment, to Deposit Account No. 02-4800. This paper is submitted in duplicate.
8. ☒ Cancel in this application original claims 1-9, 21 and 22 of the prior application before calculating the filing fee. (At least one original independent claim must be retained for filing purposes.)
9. ☒ Amend the specification by inserting before the first line the sentence: --This application is a ☐ continuation, ☒ divisional, of Application No. 09/043,933, filed March 30, 1998 which is a 371 application of PCT/FR97/01412, filed July 29, 1997.--
10. ☐ Transfer the drawings from the pending prior application to this application and abandon said prior application as of the filing date accorded this application. A duplicate of this paper is enclosed for filing in the prior application file. (May only be used if signed by person authorized under 37 C.F.R. § 1.138 and before payment of issue fee.)
11. ☐ New drawings are enclosed.
12. ☒ Priority of Application No. 96 09584 filed on July 30, 1996 in France and PCT/FR97/01412 filed on July 29, 1997 in PCT is claimed under 35 U.S.C. § 119.
- ☒ The certified copy of the priority application  
☐ is enclosed  
☒ was filed on July 29, 1997 in International Application No. PCT/FR97/01412,  
filed on July 29, 1997  
☐ has not yet been filed.
13. ☒ A preliminary amendment is enclosed.
14. ☒ A General Authorization for Payment of Fees and Petitions for Extensions of Time.
15. ☐ Also enclosed \_\_\_\_\_.
16. ☒ The power of attorney in the prior application is to all partners of Burns, Doane, Swecker & Mathis, L.L.P.
- a. ☒ The power appears in the original papers in the prior application.
- b. ☐ Since the power does not appear in the original papers, a copy of the power in the prior application is enclosed.
- c. ☒ Recognize as Associate Agent Bonnie D. Weiss, Reg. No. 43,255.

- d. ☒ Address all future communications to: (May only be completed by applicant, or attorney or agent of record.)

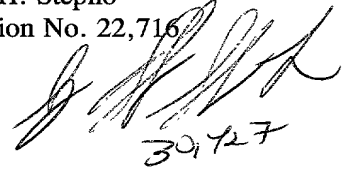
Norman H. Stepno  
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.  
P.O. Box 1404  
Alexandria, Virginia 22313-1404

February 18, 2000  
Date

By:

  
Norman H. Stepno

Registration No. 22,716

  
30127

ADDRESS OF  
SIGNATOR:

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.  
P.O. Box 1404  
Alexandria, Virginia 22313-1404  
(703) 836-6620

- ☐ inventor(s)  
☐ assignee of complete interest  
☒ attorney or agent of record  
☐ filed under 37 C.F.R. § 1.34(a)

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of	)	
	)	
Jean-Marc BALLOUL et al	)	Group Art Unit: Unassigned
	)	
Application No.: Divisional of 09/043,933	)	Examiner: Unassigned
	)	
Filed: February 18, 2000	)	
	)	
For: PHARMACEUTICAL	)	
COMPOSITION FOR TREATING	)	
PAPILLOMAVIRUS TUMORS AND	)	
INFECTION	)	

**PRELIMINARY AMENDMENT**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Prior to examination, please amend the above-identified application as follows:

**IN THE SPECIFICATION:**

In compliance with 37 C.F.R. § 1.823(a), please insert the attached paper copy of the "Sequence Listing" after the last page of the above-identified application to replace the Sequence Listing identified on pages 28-37.

**IN THE CLAIMS:**

Please cancel claims 1-9, 21 and 22.

Please amend the claims as follows:

11. (Amended) Pharmaceutical composition according to Claim 10, [characterized in that] wherein said polypeptides [have the characteristics defined in Claims 2 to 9] are derived from the E6 protein, from the E7 protein or from the E6 and E7 proteins of a papillomavirus.

Claim 12, line 2, change "or 11, characterized in that" to --, wherein--.

Claim 13, line 2, change "characterized in that" to --wherein--.

Claim 14, line 2, change "characterized in that" to --wherein--.

Claim 15, line 2, change "or 14, characterized in that" to --, wherein--.

Claim 16, line 2, change "or 15, characterized in that" to --, wherein--.

Claim 17, line 2, change "or 15, characterized in that" to --, wherein--.

Claim 18, lines 1-2, change "one of Claims 10 to 17" to --Claim 10--.

Claim 19, lines 1-2, change "one of Claims 10 to 17" to --Claim 10--.

Claim 20, lines 1-2, change "one of Claims 10 to 19, characterized in that" to --Claim 10, wherein--.

Kindly add the following claims:

--23. A method for the treatment or prevention of dysplasia or cancer of the neck of the uterus, comprising administering an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 10 to a patient in need of such treatment.

24. A method for the prevention or treatment of a papilloma-virus infection, comprising administering an effective amount of the pharmaceutical composite of claim 10 to a patient in need of such treatment.

25. Pharmaceutical composition according to Claim 10, wherein said early region polypeptide is a nononcogenic variant of the E6 and/or E7 protein of a papillomavirus.

26. Pharmaceutical composition according to Claim 10, wherein said late region polypeptide is derived from the L1 protein, the L2 protein or from the L1 and L2 proteins.

27. Pharmaceutical composition according to Claim 10, wherein said polypeptide having immunostimulatory activity is selected from the group consisting of interleukin-2, interleukin-7, interleukin-12 and the co-adhesion molecules B7.1 and B7.2.

28. Pharmaceutical composition according to Claim 27, wherein said polypeptide having immunostimulatory activity is derived from interleukin-2.

29. Pharmaceutical composition according to Claim 27, wherein said polypeptide having immunostimulatory activity is derived from the molecule B7.1.

30. Pharmaceutical composition according to Claim 10, comprising:

- (1) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region and a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus;
- (2) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from interleukin-2;

- (3) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from the molecule B7.1;
- (4) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region of a papillomavirus, a polypeptide derived from the molecule B7.1 and a polypeptide derived from interleukin-2;
- (5) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region, a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from interleukin-2;
- (6) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region, a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from the molecule B7.1; or
- (7) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region, a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus, a polypeptide derived from the molecule B7.1 and a polypeptide derived from interleukin-2.

31. Pharmaceutical composition according to Claim 10, wherein the papillomavirus is selected from the group consisting of HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 and HPV-45.--



**REMARKS**

Entry of the foregoing Amendment is respectfully requested. This division application has been filed in order to pursue prosecution of the vector claims as defined in Group II of the restriction requirement set forth in Application Serial No. 09/043,933.

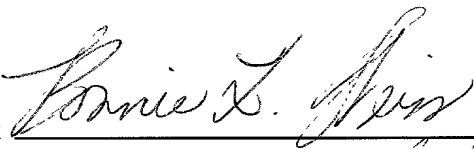
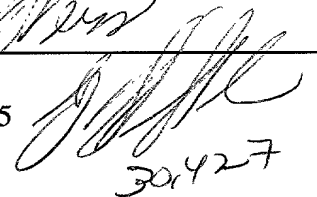
The claims have been amended to eliminate multiple dependency and to place them in better condition for U.S. patent practice.

The paper copy of the Sequence Listing for the subject application, is by this amendment, added after the last page of the application to replace the Sequence Listing identified on pages 28-37. Please delete pages 28-37 and renumber the application pages accordingly.

Should the Examiner have any questions concerning the subject application, a telephone call to the undersigned would be appreciated.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

By:   
Bonnie D. Weiss  
Registration No. 43,255 

P.O. Box 1404  
Alexandria, Virginia 22313-1404  
(703) 836-6620

Date: February 18, 2000

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR97/01412

VERIFICATION OF A TRANSLATION

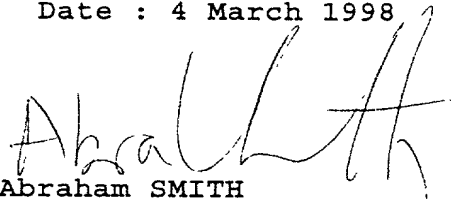
I, the below named translator, hereby declare that :

My name and post office address are as stated below ;

That I am knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/FR97/01412 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date : 4 March 1998



Full name of the translator : Abraham SMITH

For and on behalf of RWS Translations Ltd.

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,  
Gerrards Cross, Buckinghamshire,  
England.

Pharmaceutical composition for treating  
papillomavirus tumors and infection

The subject of the present invention is a pharmaceutical composition intended for the treatment or  
5 prevention of lesions associated with papillomaviruses and more particularly with human papillomaviruses (HPV) types 16, 18, 31, 33 and 45.

Papillomaviruses are DNA viruses possessing a circular genome of about 7900 base pairs surrounded by a  
10 protein capsid. A number of bovine (BPV) and human (HPV) papillomavirus types have been identified and their genome sequenced (Pfister, 1987, in *The papovaviridae : The Papillomaviruses* (Salzman and Howley publishing) Plenum Press, New York, p 1-38). It comprises an early  
15 region and a late region. The late region contains two reading frames L1 and L2 which code for the major components of the capsid. The early region contains at least the reading frames E1, E2, E4, E5, E6 and E7. The E1 and E2 expression products regulate viral replication and the  
20 expression of the viral genes whereas those of the E5, E6 and E7 regions are involved in the processes of oncogenic transformation of infected cells. Indeed, it has been shown experimentally that the BPV-1 E5 protein can transform cells *in vitro* (Schlegel et al., 1986, Science  
25 233, 464-467). The BPV-1 E6 and HPV-16 E7 proteins are involved in the induction and maintenance of oncogenic transformation. The transforming power of E7 has been demonstrated for HPV-16 and HPV-18 (Kanda et al., 1988, J. Virol. 62, 610-613; Vousden et al., 1988, Oncogene  
30 Res. 3, 1-9; Bedell et al., 1987, J. Virol. 61, 3635-3640). No function has been demonstrated in E4.

In man, HPVs are associated with pathologies ranging from benign infection of the skin to warts and to malignant tumors. These viruses are highly specific for  
35 the epithelium of the epidermis of the genital, oral and respiratory tracts. The epidemiological data strongly suggest the role of certain strains in cancer of the neck

of the uterus and of the lower pathologies, in particular HPV-16 and -18 and to a lesser degree HPV-31, -33 and -45. Cancer of the neck of the uterus is the second cause of female cancer worldwide. According to the WHO, 460,000 new cases are recorded each year, of which at least 200,000 cases are clearly associated with HPV. A series of studies demonstrates the transforming role of these viruses, their specific integration into the genome of neoplastic cells, their gene activity in cancer cells and the importance of the expression of the E6 and E7 early genes in maintaining the malignant phenotype of HPV-positive neoplastic cells (Monsenego, J. Impact Medecin, March 11, 1994).

Pathological conditions associated with HPV viruses give rise to a therapeutic problem on account of their persistent and recurrent nature. Many approaches have already been used in the treatment of these diseases, such as surgery, chemotherapy, antiviral agents and immunotherapy.

In this regard, European Patent EP 0,462,187 describes a vaccination approach using papillomavirus early genes to establish immunity against tumors resulting from the integration of the HPV genome into the cellular DNA and in which the capsid proteins are no longer expressed. Application WO 93/02184 teaches a therapeutic approach based on the use of the capsid antigens as immunogenic agents. These documents do not suggest the possibility of combining the preventive effect offered by the early polypeptides and the curative effect conferred by the late polypeptides of papillomaviruses to generate compositions suited to all the serious pathological conditions caused by HPVs. Moreover, during the past few years, it has been proposed to use polypeptides having immunostimulatory activity with the aim of activating the T cells with a result which is beneficial to a greater or lesser degree depending on the pathological conditions targeted (see for example WO 96/11279).

The present invention relates more precisely to

a preparation based on a mixture of antigens from the early and late regions of a papillomavirus or a vector expressing them simultaneously, with the aim of establishing lasting immunity against infected cells. The candidate vaccines provided within the framework of the present invention can be used for preventive purposes (immunoprophylaxy) to limit the development or propagation of viral infection to the neighboring tissues or for curative purposes (immunotherapy) to prevent or reduce tumor progression in infected patients. The use of the capsid antigens will induce the production of antibodies against the antigenic epitopes located at the surface of the viral particles, preventing the infection from becoming established for a lengthy period. The use of the early proteins will make it possible to induce immunity against the cells infected after integration of the viral DNA.

The present invention also provides a preparation combining a polypeptide from a papillomavirus and an immunostimulatory molecule. One of the advantages of such a composition is that it combines the specific immunity induced by the viral antigens and the aspecific immunity induced by the immunostimulatory molecule designed to reinforce the specific response.

The aim of the present invention is to make available to the public pharmaceutical compositions allowing the treatment of HPV infections and more particularly serious pathologies such as cancer of the neck of the uterus, having improved efficacy compared with the prior art compositions.

Accordingly, the subject of the present invention is a pharmaceutical composition intended for the treatment or prevention of a papillomavirus infection or tumor, which comprises, as therapeutic agents:

- (1) at least one polypeptide from the early region of a papillomavirus and at least one polypeptide from the late region of a papillomavirus,
- (2) at least one polypeptide from the early region

of a papillomavirus, at least one polypeptide from the late region of a papillomavirus and at least one polypeptide having immunostimulatory activity, or

- 5           (3) at least one polypeptide from an early or late region of a papillomavirus and at least one polypeptide having immunostimulatory activity.

In general, the term polypeptide refers to all or part of the native polypeptide, to a chimeric polypeptide  
10 resulting from the fusion of sequences of different origins or to a variant characterized by at least one mutation (deletion, insertion and/or substitution) of an amino acid. More particularly, a polypeptide in use within the framework of the present invention has, in  
15 particular, an amino acid sequence whose degree of similarity with the sequence of the native protein is greater than 75%, advantageously greater than 85% and, preferably, greater than 95%. The degree of similarity can be easily calculated with the aid of an appropriate  
20 computer program or by aligning the sequences so as to obtain the maximum degree of homology and by counting the number of positions in which the amino acids of the two sequences are found to be identical in relation to the total number of positions. The sequence of the HPV-16 and  
25 HPV-18 genomes is disclosed in Genebank with accession numbers K02718 and X05015 respectively.

As recalled earlier, the genome of viruses of the papillomavirus family, in particular BPV and HPV, codes for at least 8 polypeptides, two late polypeptides L1 and  
30 L2 comprising the viral capsid and 6 early polypeptides (E1, E2, E4, E5, E6 and E7) involved in the regulation and maintenance of the viral genome and in the transformation of the infected cells.

Although all the early proteins of a papilloma-  
35 virus can be used within the framework of the present invention, the choice is made advantageously to use a polypeptide derived from the E6 protein, from the E7 protein or from the E6 and E7 proteins. It may be advantageous to use a nononcogenic variant mutated at the

level of the regions involved in the process of transformation of the infected cells. Such variants are described in the literature (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105; Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556; Heck  
5 et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446; Phelps et al., 1992, J. Virol. 66, 2418-2427).

A preferred polypeptide from the late region of a papillomavirus is derived from the L1 protein, from the L2 protein or from the L1 and L2 proteins.

10 According to the particularly advantageous embodiments (2) and (3), a composition according to the invention also comprises a polypeptide having an immunostimulatory activity. "Immunostimulatory" is understood to mean the capacity to stimulate a humoral immune  
15 response by activating the B lymphocytes so as to amplify the production of antibodies directed against the papillomavirus antigens or to stimulate a cell-mediated immune response by activating the T lymphocytes so as to trigger a significant cytotoxic response against tumor  
20 cells or cells infected by a papillomavirus. As a guide, the immunostimulation can be evaluated in an animal model (by comparing the level of rejection in an animal into which a tumor expressing the target antigen has been transplanted, this being in the presence and in the  
25 absence of the immunostimulant). More generally, the means for demonstrating an immunostimulation are indicated in Roitt (in *Immunology*, 4th edition, Moby Ltd).

It is possible to use a native immunostimulatory  
30 molecule as found in a mammal, and, in particular, in man, a portion thereof, a chimeric molecule obtained from the fusion of sequences of various origins or a mutant, provided, however, the immunostimulatory function is preserved. Among all the molecules which can be  
35 envisaged, a polypeptide consisting of or derived from interleukin-2, interleukin-7, interleukin-12 and co-adhesion molecules B7.1 and B7.2 will be preferably used, interleukin-2 and the molecule B7.1 being particularly preferred within the framework of the present invention.

A preferred composition according to the invention comprises:

- 5 (1) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region and a polypeptide from the L2 region of a papilloma-virus,
- (2) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from interleukin-2,
- 10 (3) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from the molecule B7.1,
- (4) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region of a papillomavirus, a polypeptide derived from the molecule B7.1 and a polypeptide derived from interleukin-2,
- 15 (5) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region, a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from interleukin-2,
- 20 (6) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region, a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from the molecule B7.1, or
- 25 (7) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region, a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus, a polypeptide derived from the molecule B7.1 and a polypeptide derived from interleukin-2.

30 Given the observations recalled above on the incidence of infection by some HPV types in the cases of cancer of the neck of the uterus, a composition according to the invention comprises a polypeptide from a risk-carrying papillomavirus of the HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 and/or HPV-45 type, and in particular from the HPV-16 virus. Of course, in the case where the composition includes several papillomavirus antigens, they may be of common or different origin.

In general, a polypeptide from a papillomavirus



or having an immunostimulatory activity can be produced by the conventional methods of chemical synthesis or alternatively by recombinant DNA techniques (see for example Maniatis et al., 1989, *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).  
5 More particularly, a method of preparation comprises the act of culturing a cell transformed with a DNA fragment coding for the polypeptide in question so as to generate a producing cell and the act of harvesting said polypeptide from the culture. The producing cell may be of  
10 any origin and without limitation, a bacterium, a yeast or alternatively a mammalian cell, insofar as the DNA fragment considered is either integrated into its genome or integrated into an appropriate expression vector capable of replicating. Of course, the DNA fragment is  
15 placed under the control of transcriptional and translational signals allowing its expression in the producing cell. Expression vectors and control signals are known to persons skilled in the art.

20 The present invention also relates to a pharmaceutical composition intended for the treatment or prevention of a papillomavirus infection or tumor, which comprises, as therapeutic agent(s), one or more recombinant vectors into which there are inserted DNA fragments  
25 coding for:

- (1) at least one polypeptide from the early region of a papillomavirus and at least one polypeptide from the late region of a papillomavirus,
- (2) at least one polypeptide from the early region of a  
30 papillomavirus, at least one polypeptide from the late region of a papillomavirus and at least one polypeptide having an immunostimulatory activity, or
- (3) at least one polypeptide from an early or late  
35 region of a papillomavirus and at least one polypeptide having an immunostimulatory activity;

said DNA fragments being placed under the control of the elements necessary for their expression in a host cell or organism.

According to this alternative which is in fact preferred, the therapeutic agent is a vector into which there are inserted the DNA fragments coding for the polypeptides from a papillomavirus or immunostimulants as defined above. This type of composition has the advantage of cheap production and high stability under a variety of environmental conditions. In particular, the preservation conditions are less constraining.

The DNA fragments coding for a polypeptide from a papillomavirus can be obtained by cloning, by PCR (Polymerase Chain Reaction) or by chemical synthesis according to the conventional techniques commonly used starting with positive papillomavirus cells obtained from patients or from collections.

The gene coding for a polypeptide having immunostimulatory activity can also be isolated according to standard techniques from the genome of a cell (genomic type) or from the messenger RNAs of a cell in which it is expressed (complementary DNA type). Moreover, the gene in question can code for (i) a soluble molecule, which is either intracellular or secreted into the external medium, or (ii) a molecule anchored in the membrane and therefore present at the surface of the cells expressing it.

A preferred recombinant vector within the framework of the invention is a viral vector into whose genome there have been inserted the abovementioned DNA fragments so as to allow their transfer and their expression in a host cell or organism. A viral vector which can be used within the framework of the present invention may be derived in particular from a poxvirus, an adenovirus, a retrovirus, a herpesvirus or an adeno-associated virus. Advantageously, it may be a nonintegrative vector having an attenuated virulence. Such vectors, as well as the techniques for preparing them, are known to persons skilled in the art.

In the case where an adenoviral vector is used, there will be preferably used a vector which is non-replicative by virtue of the deletion of regions

essential for replication and, in particular, of the majority of the E1 region so as to avoid its propagation within the host organism or the environment. It goes without saying that other regions of the adenoviral genome can be modified or deleted insofar as the defective essential functions are trans-complemented. A preferred adenoviral vector according to the invention will retain the sequences essential for encapsidation, namely the 5' and 3' ITRs (Inverted Terminal Repeat) and the encapsidation region. The various adenoviral vectors as well as the techniques for preparing them are conventional and are described in Graham and Preveet (1991, in *Methods in Molecular Biology*, vol 7, p 109-128; Ed: E.J. Murey, The Human Press Inc.) and in international application WO 94/28152. If a retrovirus is used, the LTRs (Long Terminal Repeat) and the encapsidation sequences will be retained (see for example Naviaux and Verma, 1992, *Current Opinion in Biotechnology* 3, 540-547).

According to an advantageous embodiment, a recombinant viral vector according to the invention is derived from a poxvirus and, in particular, from an avian poxvirus such as the canarypox virus, a fowlpox virus or a vaccinia virus, the latter being preferred. Among all the vaccinia viruses which can be envisaged within the framework of the present invention, the Copenhagen, Wyeth and modified Ankara (MVA for Modified Vaccinia Ankara Virus) strains are preferably chosen. The general conditions for obtaining a vaccinia virus capable of expressing a heterologous gene are taught in European Patent EP 83 286 and application EP 206 920. As for the MVA virus, it is more particularly described in (Mayr et al., 1975, *Infection* 3, 6-14; Sutter and Moss, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10847-10851).

Of course, in the framework of the present invention, the DNA fragments are placed under the control of the elements necessary for their expression. These include the appropriate elements for regulation of transcription as well as signals for initiation and

termination of translation. The promoter is of particular importance. In general, use will be made of a promoter which is functional in the host organism or cell which it is desired to treat and which is suited to the vector used. In addition, it can be modified so as to contain regulatory sequences, for example an element for activating transcription or sequences responding to certain cellular signals. In this regard, it may be advantageous to use a tissue-specific promoter since the lesions associated with papillomaviruses are located at the level of the genital tracts, or a promoter responding to tumor-specific signals (for example which is activated in the presence of growth factors which are generally overexpressed by tumor cells) so as to limit the expression to tumor cells alone.

Among the promoters which can be envisaged within the framework of the invention, there may be mentioned the SV40 (Simian Virus 40) promoters, the HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl-coenzyme A) promoters, the TK (Thymidine Kinase) promoters, the CMV (cytomegalovirus) promoters, the RSV (Rous Sarcoma Virus) promoters, the adenovirus MLP (Major Late Promoter) promoters which are suited to adenoviral vectors and the Mo-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) LTR promoters which are more specific to retroviral vectors. When the vector is derived from a poxvirus, the promoter will be preferably the promoter of a gene of the poxvirus used, for example the promoter of the gene coding for the protein 7.5K, H5R, TK or K1L of the vaccinia virus. They are described in the literature and can be cloned from the viral genome by conventional techniques.

Moreover, the elements necessary for the expression may also comprise sequences enhancing the expression or maintenance in the host cell (intron, signal sequence, sequence for termination of transcription, site of initiation of translation, sequences modifying the presentation of the polypeptide to the cells of the host's immune system and the like). However, for a vector derived from a poxvirus, the use of introns will be

avoided.

A composition according to the invention can be obtained either with several recombinant vectors, each expressing a given polypeptide, or with a single vector  
5 expressing the DNA fragments corresponding to the chosen polypeptides placed under the control of independent or common elements. According to the latter option, there may be used sequences which make it possible to initiate translation internally (IRES) or fusions of the different  
10 genes in phase.

The general conditions for obtaining a recombinant vector in use in the present invention are widely described in the state of the art. As regards a poxviral vector, reference may be made to European Patent  
15 EP 83 286 the content of which is incorporated herein by reference. These conditions are applicable to the other viruses acceptable as a vector, which possess a non-essential genomic region into which the expression units may be incorporated. Of course, they may be inserted in  
20 the same locus or in a different locus. For example, when the Copenhagen strain of a vaccinia virus is used, the preferred site of insertion is the TK locus and/or the K1L locus. The insertion at the level of the viral TK gene has the effect of inactivating it and thus of  
25 facilitating the selection of the recombinants. In the context of the MVA strain of a vaccinia virus, the insertion of the immunostimulatory and papillomavirus genes can be carried out within one of the excisions I to VI and, preferably, the excision zone II or III (Meyer et  
30 al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038; Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032-1040).

In accordance with the objectives pursued by the present invention, a recombinant vector may, in addition, comprise a unit for expression of a selectable marker  
35 gene in order to facilitate the steps for isolating and purifying the recombinant virus. There may be mentioned in particular the Neo gene which confers resistance to the antibiotic G418, the pac gene for resistance to puromycin, the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) TK

gene which confers sensitivity to certain nucleoside analogs such as ganciclovir or acyclovir, the bacterial genes *LacZ* coding for  $\beta$ -galactosidase and *gus A* coding for  $\beta$ -glucuronidase. The latter two enzymatic markers  
5 make it possible to pick out the recombinant viruses by staining in the presence of the substrates X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside) and XglcA (5-bromo-6-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucoronide) respectively.

10 A pharmaceutical composition according to the invention for the treatment or prevention of a papillomavirus infection or tumor comprises one or more recombinant vectors derived from the Copenhagen or MVA strain of a vaccinia virus into which there are inserted:

- 15 (1) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for the molecule B7.1,
- 20 (2) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for interleukin-2,
- 25 (3) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the molecule B7.1 and a DNA fragment coding for interleukin-2,
- 30 (4) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus,
- 35 (5) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for the molecule B7.1,

(6) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for interleukin-2, or

(7) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the molecule B7.1 and a DNA fragment coding for interleukin-2.

On the other hand, a pharmaceutical composition according to the invention more particularly intended for immunoprophylaxy comprises one or more recombinant vectors derived from the Copenhagen or MVA strain of a vaccinia virus, into which there are inserted:

(1) a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for the molecule B7.1,

(2) a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for interleukin-2, or

(3) a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for interleukin-2 and a DNA fragment coding for the molecule B7.1.

A composition according to the invention can be prepared according to methods known in the field of vaccines and the applicable doses may vary within a wide range. They depend in particular on the polypeptides and on the virus used, the pathological condition to be treated, the condition of the patient and other parameters which may be evaluated by the clinician. However,

in general, the dose of virus per kilo will be from  $10^4$  to  $10^{11}$ , advantageously from  $10^6$  to  $10^{10}$  and, preferably, from  $10^7$  to  $10^9$  plaque forming units (pfu) when the therapeutic agent is a viral vector and from 0.05 to 500 mg, advantageously from 0.5 to 200 mg and, preferably, from 1 to 100 mg when the therapeutic agent is of polypeptide origin.

A composition according to the invention can be administered by any conventional route of administration, in particular by the intravenous, intramuscular, subcutaneous or subepithelial route, or alternatively by scarification. In the case of an accessible tumor, it is also possible to use direct injection into the site or in the vicinity of the tumor or to use topical application. As a vaccine, a composition according to the invention can be administered according to practices which are common in the field, for example as a single dose or a dose repeated once or several times after a certain time interval. On the other hand, in the context of a curative treatment, it can be administered frequently for a period which is sufficient for the treatment to be effective. When the therapeutic agent is a viral vector, this virus is preferably in a live form. In the case of a poxviral vector, the use of an attenuated strain such as the thymidine kinase negative Copenhagen strain or MVA strain will be preferred. Finally, a recombinant viral vector can be attenuated by an appropriate chemical treatment known to persons skilled in the art. However, injecting a killed recombinant vector can also be envisaged.

According to a preferred embodiment, a pharmaceutical composition according to the invention comprises a therapeutically effective quantity of a recombinant vector in combination with a pharmaceutically acceptable carrier. The carrier is chosen so as to allow its administration by injection into humans or into animals. It may also comprise a vehicle, a diluent and/or an adjuvant and may be provided in liquid or freeze-dried form.

The present invention also relates to a pharmaceutical composition according to the invention, as a



medicament for the treatment or prevention of cancer of the neck of the uterus, of a dysplasia of the neck of low grade and of a papillomavirus infection.

Finally, the present invention also relates to a method of treating or preventing the abovementioned pathological conditions, according to which a pharmaceutically effective quantity of a mixture of polypeptide or of a recombinant vector in use in the present invention is administered to an individual needing such a treatment.

The present invention is illustrated by reference to the following figures.

Figure 1 is a diagrammatic representation of the vector pTG5021 allowing the transfer, to the TK locus of the Copenhagen vaccinia, of the HPV-16 late genes L1 and L2 placed under the control of the promoter p7.5K, the two cassettes being in opposite orientation relative to each other.

Figure 2 is a diagrammatic representation of the vector pTG5065 allowing the transfer, to the K1L locus of the Copenhagen vaccinia, of the HPV-16 early genes E6 and E7 placed under the control of the promoter pH5R (the two cassettes being in opposite orientation relative to each other), of the human IL-2 (IL2h) gene placed under the control of the promoter p7.5K and of the marker gene LacZ (btaGAL) placed under the control of the promoter pK1L.

Figure 3 diagrammatically illustrates the strategy which can be used to introduce the HPV-16 late genes L1 and L2 into the exclusion zone II of an MVA vaccinia virus, the left and right recombination arms being indicated (BRG2 and BRD2) respectively.

#### EXAMPLES

The present invention is described more fully with the aid of the following examples, without being limited as a result.

The constructions described below are carried out according to the general genetic engineering and

molecular cloning techniques detailed in Maniatis et al., (1989, *supra*) or according to the manufacturer's recommendations when a commercial kit is used. Synthetic oligonucleotide site-directed mutagenesis *in vitro* is carried out with the aid of the kit distributed by Amersham. PCR amplification techniques are known to persons skilled in the art (see for example PCR Protocols - A guide to methods and applications, 1990, published by Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press Inc.). As regards the repair of restriction sites, the technique used consists in filling the protruding 5' ends with the aid of the large fragment of DNA polymerase I of *E. coli* (Klenow).

The cloning steps, the recombinant M13 bacteriophages are multiplied on the *E. coli* NM522 strain (Stratagene) in an agar-based minimum medium (7.5% agar) or in a liquid rich LBM medium. The recombinant plasmids carrying the ampicillin resistance gene are replicated in the *E. coli* strains C600 (Stratagene), BJ5183 (Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166, 557-580) and NM522 on agar or liquid medium supplemented with 100 µg/ml of antibiotic. The BJ5183 strain is preferably used when the cloning is carried out by homologous recombination (Bubeck et al., 1993, *Nucleic Acid Res.* 21, 3601-3602).

The construction of the recombinant vaccinia viruses is carried out according to the conventional technology in the field which is disclosed in the documents already cited and in Mackett et al., (1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7415-7419) and Mackett et al., (1984, *J. Virol.* 49, 857-864).

EXAMPLE 1: Construction of the Copenhagen vaccinia virus VVTG5021&5065 expressing the HPV-16 E6, E7, L1 and L2 genes and the human IL-2 gene

A. Isolation of the HPV16 L1 and L2 genes

The fragments coding for the L1 and L2 proteins are isolated by PCR from the genomic DNA of Caski cells

(ATCC 1550) according to general prior art techniques. The fragment for amplification, carrying the L1 sequences, is subcloned into the vector M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99) to give the construct M13TG8171. The sequence of the cloned L1 gene reveals several mutations compared with the sequence contained in Genebank (accession K02718): C in place of an A at position 248, C in place of an A at position 253, G in place of an A at position 537, G in place of a C at position 682, G in place of an A at position 874, insertion of a triplet ACT at position 1393, deletion of a triplet GAT at position 1390. The insertion of the PCR fragment, carrying the L2 sequences, into the vector M13TG6131 leads to M13TG9126. 5 point mutations are observed compared with the sequence disclosed in Genebank: C in place of a T at position 378, A in place of a G at position 691, A in place of a G at position 702, G in place of an A at position 990 and C in place of an A at position 1092. As a guide, the vector M13TG6131 is derived from M13TG131 (Kieny et al., 1983, *supra*) by mutation of the internal *Bgl*III site situated outside the multiple cloning sites.

*B. Construction of the vector pTG5021 for the transfer of the L1 and L2 genes into the TK locus of the genome of the vaccinia virus*

The gene coding for the L1 protein is modified by creating a *Bgl*III site upstream of the initiator ATG. The mutated gene is excized from the preceding vector (M13TG8185) by *Bgl*III-*Sac*I digestion and inserted between the *Bam*HI and *Sac*I sites of pTG186-poly. The resulting construct is called pTG4019. The transfer vector pTG186-poly is described in detail in French Patent 2,583,429. It has 10 restriction sites for the insertion of the gene to be transferred and the promoter p7.5K for controlling its expression.

The gene coding for the L2 protein is isolated from M13TG9126 by *Bgl*III-*Hind*III digestion and then cloned

between the *Bam*HI and *Hind*III sites in 3' of the 7.5K promoter. M13TG9127 is obtained into which a *Sal*I site is introduced upstream of the promoter by localized mutagenesis. The expression unit "p7.5K-L2 gene" is isolated from the mutated vector M13TG9129 and cloned into the *Sac*I site of the transfer vector pTG4019 such that the two cassettes p7.5K-L1 and p7.5K-L2 are in opposite orientation. The construct thus obtained pTG5021 is represented in Figure 1. The expression units are transferred into the genome of the Copenhagen strain of the vaccinia virus by homologous recombination. The recombinant virus designated VVTG5021 is isolated by selection with 5-bromodeoxyuridine (5BUDR).

#### C. Isolation of the HPV16 E6 and E7 genes

The E6 and E7 genes are isolated from the Caski cell line as described in Examples 2 and 3 of European Patent EP 0,462,187. Two constructs were derived from the clone M13E7/E6 containing the HPV-16 E6 and E7 genes so as to facilitate subsequent cloning steps. The first, designated M13TG8188, results from the introduction by site-directed mutagenesis of *Pst*I and *Bam*HI sites upstream and downstream, respectively, of the E7 gene, and the second, M13TG8189, comprises a *Pst*I site upstream of the E6 gene. The introduction of point mutations upstream of an initiator ATG and downstream of a stop codon are within the capability of persons skilled in the art.

The combination of the HPV-16 E7 protein with the product of the retinoblastoma gene has been demonstrated by various authors (see for example Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105) and correlated with its transforming power. For obvious safety reasons, a nononcogenic mutant, from which the sequences coding for amino acids 21 to 26 of the native E7 protein which are involved in the transformation function have been deleted, is generated by site-directed mutagenesis of the vector M13TG8188 with the aid of the oligonucleotide oTG5118

(SEQ ID NO: 1). M13TG9104 is obtained. The mutated E7 gene is designated hereinafter E7\*.

Likewise, it has been demonstrated that the HPV-16 E6 protein could interact with the product of expression of the tumor suppressor gene p53 (Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556). The domain involved in this interaction has been clearly defined and is situated between residues 111 to 115 of the native protein. The vector M13TG9125 is generated by mutagenesis of M13TG8189 with the aid of the oligonucleotide oTG5377 (SEQ ID NO: 2). The mutated E6 gene is designated hereinafter E6\*.

D. Construction of the transfer vector pTG5065 carrying the HPV-16 E6 and E7 genes and the human IL-2 gene which are integrated into the K1L locus.

The 5.2 kb *EcoRI* K fragment of the left end of the Copenhagen vaccinia virus genome (Guillard et al., 1985, J. Virol. 53, 316-318) is cloned into the plasmid pUC8 (Gibco BRL) linearized with *EcoRI*. The vector thus obtained is then subjected to controlled digestion with *BglIII* followed by ligation so as to delete an 855 bp fragment coding for the K1L host restriction gene (Guillard et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 5573-5577). The 3.4 kb *BglIII* fragment is isolated from this intermediate construct designated pUC8Khr and then cloned into the *BamHI* site of the plasmid pUC7 (Gibco BRL). pBAC1 is generated, into which an *XhoI* adaptor is introduced on the left of the unique *BglIII* site. After digesting with *XhoI* and *BglIII*, a *SalI*-*BglIII* fragment carrying the p7.5K vaccinia promoter is inserted. The two *EcoRI* sites are removed by *EcoRI* digestion followed by treatment with Klenow and religation. The vector pTG2147 is obtained by introducing into the unique *BglIII* site a multiple cloning site isolated from the vector p poly II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) isolated in the form of a *BglIII*-*BamHI* fragment. It therefore comprises the recombination arms allowing insertion into the K1L

locus surrounding the p7.5K promoter followed by the restriction sites.

The E6\* and E7\* genes are cloned downstream of the vaccinia promoter pH5R contained in the vector M13TG9132, to give M13TG9138 and M13TG9139, respectively. As a guide, the vector M13TG9132 comes from the insertion of the promoter of the H5R gene isolated by PCR from the viral genome into the phage M13TG6131.

Moreover, the cDNA coding for human interleukin-2 is isolated from the plasmid pTG36 (French Patent 2,583,770), introduced into an intermediate vector and taken out again by *SalI*-*BamHI* digestion so as to be inserted into the transfer vector pTG2147 targeting the locus K1L. The insertion is made at the level of the *PstI* and *XbaI* sites situated downstream of the promoter p7.5K, with the aid of cloning adaptors. pTG5056 is obtained.

The expression unit pH5R-E6\* is isolated from the vector M13TG9139 in the form of a *BglIII*-*BamHI* fragment which is introduced into the *BamHI* site of the vector pTG5056. The vector pTG5060 is generated. The expression unit pH5R-E7\* is purified from M13TG9138 and inserted at the *BamHI* site of the vector pTG5060, to give pTG5062. It is indicated that insertion at the K1L locus leads to recombinant viruses having a replication capacity which is reduced or even destroyed in certain cell types. For these reasons, a positive selectable marker is introduced to facilitate identification of the recombinant viruses. The vector pTG5065 results from the cloning, into the *BamHI* site of pTG5062, of an expression cassette "pK1L-LacZ gene" isolated from the plasmid pIV75 (Chen et al., 1993, *Virology* 196, 682-693) by *BglIII*-*BamHI* cleavage. As visualized in Figure 2, it allows the transfer of the E6\*, E7\* and IL-2 units into the K1L locus of the vaccinia virus.

The recombinant vaccinia virus, called VVTG5065, is generated by homologous recombination after transfection of the vector pTG5065 into chicken embryo cells infected with the wild-type Copenhagen vaccinia and picked out by staining under agar with X-Gal. The vaccinia

viruses VVTG5021 and VVTG5065 are used in double infection tests. The double recombinants are selected according to the two markers: formation of blue plaques in the presence of X-Gal and deletion of the TK marker. These, called VVTG5021&5065, express the units p7.5K-IL-2, pH5R-E6\* and pH5R-E7\* integrated at the K1L locus and the units p7.5K-L1 and p7.5K-L2 integrated at the TK locus.

The expression of the HPV genes can be verified by Western-blot analysis with the aid of appropriate monoclonal or polyclonal antibodies or by inverse PCR. The production of IL-2 can be evaluated by ELISA test or by CTL test as described in the literature. As a guide, the level of expression in vitro is of the order of 60 ng/ml/10<sup>6</sup> cells infected with 1 pfu/cell and 24h.

EXAMPLE 2: Construction of the Copenhagen vaccinia virus expressing the E6 and E7 genes and the human IL-2 gene

The cDNA coding for human interleukin-2 is isolated from the plasmid pTG36 by PstI digestion and inserted into the PstI site of the plasmid pTG186, giving pTG188. The virus obtained by homologous recombination is called VVTG188.

The E6\* gene is isolated from M13TG9125 in the form of a PstI-BamHI fragment and inserted downstream of the 7.5K promoter between the PstI and XbaI sites of pTG2147 in the presence of a BamHI-XbaI adaptor, giving pTG5057. The E7\* gene is placed under the control of the H5R vaccinia promoter producing M13TG9138 and the cassette bordered by the BamHI-BglIII sites is subcloned into the BamHI site of pTG5057. pTG5059 is obtained, into whose BamHI site the LacZ selectable marker is inserted under the control of the promoter of the K1L vaccinia gene by BglIII-BamHI digestion of the vector pIV75. The resulting construct is designated pTG5061 and the virus generated by homologous recombination with the vaccinia genome VVTG5061.

A recombinant vaccinia virus expressing the E6\*

and E7\* genes integrated at the K1L locus and the human IL-2 gene integrated at the TK locus is obtained by co-infection of chicken embryo cells with the viruses VVTG5061 and VVTG188. As a guide, the latter produces a quantity of IL-2 approximately greater than 400 ng per 10<sup>6</sup> cells infected at 1 pfu per cell for 24h. The doubly recombinant virus is designated VVTG5061&188.

EXAMPLE 3: Construction of a Copenhagen vaccinia virus expressing the E6 and E7 genes, and the gene coding for the human adhesion cofactor B7.1

The cDNA coding for B7.1 is isolated from an mRNA preparation obtained from the Daudi cell line (ATCC CCL-213) by inverse PCR using the primers oTG6353 and oTG6352 (SEQ ID NO: 3 and 4). It is indicated that the sequence of the gene is disclosed in Genebank under accession number M27533. The amplified fragment is cloned between the BglIII and EcoRI sites of M13TG6131 leading to M13TG9149 and then between the BamHI and EcoRI sites of pTG186. The construct is called pTG5090 and the virus obtained by homologous recombination VVTG5090. A vaccinia virus expressing the HPV-16 E6\* and E7\* genes integrated at the K1L locus and the human B7.1 gene integrated at the TK locus can be obtained by co-infection of chicken embryos with the viruses VVTG5061 and VVTG5090. The recombinant virus is designated VVTG5061&5090.

EXAMPLE 4: Construction of an MVA strain of a vaccinia virus expressing the E6 and E7 genes and the B7.1 gene integrated into the zone of excision III

The MVA virus is derived from the Ankara strain of the vaccinia virus. It is not capable of generating infectious particles on mammalian cells but develops satisfactorily on chicken embryo fibroblasts. Its adaptation to these cells caused the excision of 6 regions which are not essential for its development and its



infectious cycle on this type of cells (disappearance of about 15% of the viral genome; Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038). Exogenous genetic material can be integrated at the level of any of these excision zones. Within the framework of the present invention, excisions II and III, which are located at the level of the *HindIII* restriction fragments N and A respectively, are used (Altenburger et al., 1989, Arch. Virol. 105, 15-27).

In a first instance, the vector pTG6019 allowing insertion into the excision zone III of the MVA virus is constructed. The homologous recombination arms on either side of the excision zone III are isolated by PCR from the viral genome (see American Patent US 5,185,146) and the primers oTG7637 and oTG7638 (SEQ ID NO: 5 and 6) for the left arm and oTG7635 and oTG7636 (SEQ ID NO: 7 and 8) for the right arm. The amplified fragments are cloned into the *EcoRI* site of the vector pTG1E, to give pTG6019. The genetic material to be transferred is inserted between the two recombination arms. The vector pTG1E is similar to pTG1H (French Patent 2,583,429) except for the presence of an *EcoRI* adaptor in place of multiple cloning sites.

Firstly, a cassette for expression of the *gus A* marker gene is inserted. The 7.5K promoter is first cloned into the *BamHI* site of pTG6019. pTG6021 is obtained into whose *BamHI* site the *gus A* gene generated in the form of a *BglIII*-*BamHI* fragment is inserted. This can be obtained from the sequence disclosed in the literature. The resulting construct is called pTG6022. The presence of the marker will make it possible to discriminate between the wild-type viruses and the recombinant viruses by detecting the GUS enzymatic activity with the substrate XglcA. A red color reveals the  $\beta$ -glucuronidase activity. However, for the purpose of a clinical application, it may be useful to be able to remove this bacterial marker from the final product after selection of the recombinant viruses. To do this, advantage is taken of the capacity of vaccinia to delete

the sequences between two homologous sites. Accordingly, a second promoter p7.5K is inserted downstream of the *gus* A gene in a sense orientation relative to that which directs its expression. The vector pTG6022 is modified by  
5 insertion between the *Bam*HI and *Sac*I sites of a fragment p7.5K provided with cohesive ends, to give pTG6025.

The latter is completed by the insertion of the mutated E6\* and E7\* gene expression cassettes. A new promoter sequence p7.5K is first introduced, this time in  
10 antisense orientation relative to the preceding ones. This construct, called pTG6039, therefore comprises the labile GUS cassette "p7.5K → *gus* A-p7.5K→" followed by p7.5K in the opposite orientation. In parallel, the E6\* and E7\* genes are isolated from the vectors M13TG9104 and  
15 M13TG9125, respectively, by *Bam*HI and *Pst*I digestion and assembled in opposite orientation with respect to each other at the *Pst*I site of M13TG6131. The whole is taken out in the form of a *Pst*I fragment which is inserted into pTG6039 linearized with this same enzyme. The vector  
20 pTG6056 is obtained which contains the following sequences p7.5K → *gus* A-p7.5K → E7\*-E6\* ← p7.5K".

The immunostimulatory gene B7.1 is integrated into the latter construct. To do this, the vector pTG6056 is cleaved with *Hind*III and *Kpn*I before being ligated in  
25 the presence of the oligonucleotides oTG10451 and oTG10450 (SEQ ID NO: 9 and 10), to generate pTG6070. The latter will allow the cloning of the expression cassette "pH5R-B7.1" by homologous recombination. To this effect, the B7.1 sequences isolated from M13TG9149 are cloned  
30 downstream of the vaccinia promoter pH5R, to form M13TG9184. The *Bgl*III-*Eco*RI fragment carrying the cassette is integrated into the vector pTG6070 linearized with *Xho*I by homologous recombination in *E. coli*. The vector pTG6079 is obtained which in total comprises the *gus* A  
35 marker gene in a "labile" form and the cassettes for expression of the HPV-16 early genes as well as a cassette for the costimulation gene B7.1. The virus generated by homologous recombination with the MVA genome is designated MVATG6079.

The units for expression of the HPV-16 late genes can be inserted into the excision zone II with the aid of the transfer vector pTG6018. It is constructed by inserting into the *EcoRI* site of pTG1E left and right recombination arms bordering the II excision, which are generated by PCR using the primers oTG7665 and oTG7584 (SEQ ID NO: 11 and 12) and oTG7639 and oTG7640 (SEQ ID NO: 13 and 14). As above, a cassette for expression of a positive marker is integrated between the two arms in order to facilitate the detection of the recombinant viruses, it being possible to remove it after the selection step (Spehner et al., 1990, J. Virol. 64, 527-533). The vector pTG6020 results from the cloning of the *LacZ* gene placed downstream of the promoter p7.5K into the vector pTG6018 linearized with *Bam*HI. pTG6020 is modified by inserting a sequence p7.5K between its *Bam*HI and *Sac*I sites situated downstream of the *LacZ* gene. pTG6024 is obtained. The cassettes L1 and L2 can then be introduced according to a strategy as shown in Figure 3.

20 EXAMPLE 5: Construction of an MVA strain of vaccinia virus expressing the E6 and E7 genes, and the IL-2 gene integrated into the excision zone III

The same strategy as above is used to introduce the IL-2 gene into the vector pTG6056. After cloning the recombinant oligonucleotides oTG10503 and oTG10502 (SEQ ID NO: 15 and 16) to produce pTG6076, the latter is cleaved with *Xho*I and the *Bgl*III-*Eco*RI fragment is prepared from M13TG9185 (pH5R-IL-2) inserted by homologous recombination. The vector pTG6090 thus obtained comprises the *gus* A marker gene in a "labile" form, the cassettes for expression of the HPV-16 early genes as well as a human IL-2 gene cassette. The recombinant virus obtained by homologous recombination with the MVA genome is designated MVATG6090. The late genes can be integrated into the excision zone II using pTG6018, as indicated above.

EXAMPLE 6: Validation of the vector VVTG5021&5065 in an animal model

*A. Toxicity studies*

Nude mice received  $10^7$  pfu of VVTG5021&5065 or  
5  $10^7$  pfu of wild-type vaccinia virus by the intravenous,  
intramuscular, subcutaneous or intracranial route. Groups  
of 5 mice were formed depending on the type of virus  
injected and the route of administration and the number  
10 of animals having lesions linked to vaccinia was evaluated  
26 days after the injection. The mice which received  
the recombinant virus showed no lesion regardless of the  
route of administration used, whereas the majority of the  
animals treated with the wild-type vaccinia have lesions  
whose frequency and seriousness depends on the route of  
15 administration. Furthermore, deaths are recorded in the  
case of an intravenous and intracranial injection. These  
data show that VVTG5021&5065 is attenuated compared with  
the wild-type virus and that it does not cause lesions  
even after an intracranial injection.

20 *B. Immunoprophylaxy experiments with VVTG5021&5065*

C57BL6 mice were vaccinated three times by the  
subcutaneous route with  $10^7$  pfu of VVTG5021&5065. Three  
days after the last immunization, these animals are  
challenged with  $10^3$  E7W1 cells implanted subcutaneously.  
25 As a guide, the E7W1 cells are obtained from a murine  
lymphoma line transfected with a vector expressing the  
HPV-16 oncogenic E7 gene. The percentage survival of the  
animals as a function of time is compared to that  
obtained with control mice treated with  $10^7$  pfu of a  
30 nonrecombinant vaccinia virus VVTG186 (derivative of the  
TG186 vector described above). Monitoring of mortality  
shows a difference between the two groups. In the control  
group, 100% of the animals died at D36 whereas 40% of the  
animals vaccinated with VVTG5021&5065 were still alive at  
35 D36 and more than 30% at D51.

Thus, the recombinant viruses expressing HPV antigens and an immunostimulatory gene exhibit antitumor activity against tumor cells expressing the HPV-16 E7 oncogene.

5 C. Immunotherapy experiments

10 C57BL6 mice are inoculated with  $10^3$  E7W1 cells implanted subcutaneously (D0).  $10^7$  pfu of recombinant viruses are then administered, also subcutaneously at D3 and then D6 and finally D9 and the percentage survival of the animals is determined compared with the control animals which received a nonrecombinant virus. Whereas 100% of the control animals died, a notable increase in the survival of the animals injected with a mixture of VVTG5061§5021 and VVTG188 is observed. Similar results 15 are obtained after administration of VVTG5065§5021 and VVTG188.

20 These immunotherapy experiments were repeated using a different tumor model, BMK16myc cells replacing the E7w1 cells. The BMK16myc cells are kidney cells from newborn mice transfected with the HPV-16 genome and the murine c myc gene. The animals are treated with  $10^7$  MVATG6090 viruses expressing the HPV-16 E6\* and E7\* genes and the human IL-2 gene. Compared with the controls, the treated mice exhibit a delayed tumor growth up to D15.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

5 (A) NAME: TRANSGENE SA  
(B) STREET: 11 rue de Molsheim  
(C) CITY: Strasbourg  
(E) COUNTRY: France  
(F) POSTAL CODE: 67082  
10 (G) TELEPHONE: (33) 88 27 91 00  
(H) TELEFAX: (33) 88 27 91 11

(ii) TITLE OF INVENTION: Pharmaceutical composition for  
treating papillomavirus tumors and infection

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 16

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

15 (A) MEDIUM TYPE: Tape  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25  
(EPO)

20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 36 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
25 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

30 (A) ORGANISM: Human papillomavirus  
(B) STRAIN: HPV-16

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG5118 (E7 deleted 21 to 26)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

TCTGAGCTGT CATTTAATTG AGTTGTCTCT GGTTC

36

5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 32 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

10 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

15 (A) ORGANISM: Human papillomavirus

(B) STRAIN: HPV-16

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG5377 (E6 deleted 111 to 115)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

20 TGTCCAGATG TCTTTGCAGT GGCTTTTGAC AG

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 35 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

25 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Homo sapiens

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide

5

oTG6353 (PCR gene B7.1)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

TCAGCCCCTG AATTCTGCGG ACACTGTTAT ACAGG

35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

(A) LENGTH: 33 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

15

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Homo sapiens

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide

20

oTG6352 (PCR gene B7.1)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

TTGACCCTAA AGATCTGAAG CCATGGGCCA CAC

33

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25

(A) LENGTH: 32 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)



(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

5

(A) ORGANISM: Vaccinia virus

(B) STRAIN: Modified Ankara

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG7637 (PCR zone III)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

GGGGGGGAAT TCAGTAAACT TGACTAAATC TT

32

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 39 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

15

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:

20

(A) ORGANISM: Vaccinia virus

(B) STRAIN: Modified Ankara

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG7638 (PCR zone III)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

25 GGGGGGGGAT CCGAGCTCAC CAGCCACCGA AAGAGCAAT

39

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 32 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

5 (iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Vaccinia virus

(B) STRAIN: Modified Ankara

10 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG7635 (PCR zone III)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

GGGGGGGGAT CCGGAAAGTT TTATAGGTAG TT

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

15 (A) LENGTH: 30 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

20 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Vaccinia virus

(B) STRAIN: Modified Ankara

25 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG7636 (PCR zone III)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

GGGGGGGAAT TCTTTGTATT TACGTGAACG

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 78 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

10 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG10451

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

CTTATACAGG GCGTACACTT TCCCTTCTCA ATCTCTCTCG AGTTGTATTT ATTTTCATTT 60  
15 TTAAAGTATA GAATAAAA 78

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 20 (A) LENGTH: 86 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: single  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: YES

25 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG10450

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

AGCTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAAATACAA CTCGAGAGAG ATTGAGAAGG 60

GAAAGTGTAC GCCCTGTATA AGGTAC 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 39 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
- 10 (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
- (A) ORGANISM: Vaccinia virus
  - (B) STRAIN: Modified Ankara
  - 15 (C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG7665 (PCR zone II)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

ATGGTACCGA ATTCCATCTA CCAATTCATC CAACAACAT 39

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

- 20 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 41 base pairs
  - (B) TYPE: nucleic acid
  - (C) STRANDEDNESS: single
  - (D) TOPOLOGY: linear
- 25 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTI-SENSE: YES
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Vaccinia virus
- (B) STRAIN: Modified Ankara
- (C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG7584 (PCR zone II)

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

GGCTGCAGGA TCCGAGCTCA TCATGACGTC CTCTGCAATG G 41

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

15 (iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Vaccinia virus
- (B) STRAIN: Modified Ankara
- (C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG7639 (PCR zone II)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

GGGGGGGGGAT CCTGTGAATC ATCCATTCCA CT 32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:

5

(A) ORGANISM: Vaccinia virus

(B) STRAIN: Modified Ankara

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG7640 (PCR zone II)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

GGGGGGGAAT TCGTTACTAA ATTGCAAGGA AAT

33

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

15

(A) LENGTH: 69 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

20

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG10503

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

CTCAAGTCAG TGGTGGAGATG ATGCTTTGAC AACTCGAGTT TATTTTCATT TTSTAAGTAT

60

AGAATAAAA

69

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 77 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

5 (iii) ANTI-SENSE: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide  
oTG10502

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16:

10 AGCTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAAACTCGA GTTGTCAAAG CATCATCTCA 60

ACACTGACTT GAGGTAC 77

Claims

1. Pharmaceutical composition intended for the treatment or prevention of a papillomavirus infection or tumor, which comprises, as therapeutic agents:

- 5 (1) at least one polypeptide from the early region of a papillomavirus and at least one polypeptide from the late region of a papillomavirus,
- (2) at least one polypeptide from the early region of a papillomavirus, at least one polypeptide from the late region of a papillomavirus and at least one polypeptide having immunostimulatory activity, or
- 10 (3) at least one polypeptide from an early or late region of a papillomavirus and at least one polypeptide having immunostimulatory activity.

- 15 2. Pharmaceutical composition according to Claim 1, characterized in that the polypeptide from the early region of a papillomavirus is derived from the E6 protein, from the E7 protein or from the E6 and E7 proteins of a papillomavirus.

- 20 3. Pharmaceutical composition according to Claim 2, characterized in that the polypeptide from the early region of a papillomavirus is a nononcogenic variant of the E6 and/or E7 protein of a papillomavirus.

4. Pharmaceutical composition according to one of
- 25 Claims 1 to 3, characterized in that the polypeptide from the late region of a papillomavirus is derived from the L1 protein, from the L2 protein or from the L1 and L2 proteins.

5. Pharmaceutical composition according to one of
- 30 Claims 1 to 4, characterized in that the polypeptide having an immunostimulatory activity is selected from the group consisting of interleukin-2, interleukin-7, interleukin-12 and the co-adhesion molecules B7.1 and B7.2.

- 35 6. Pharmaceutical composition according to Claim 5, characterized in that the polypeptide having immunostimulatory activity is derived from interleukin-2.



7. Pharmaceutical composition according to Claim 5 or 6, characterized in that the polypeptide having immunostimulatory activity is derived from the molecule B7.1.

5 8. Pharmaceutical composition according to one of Claims 1 to 7, characterized in that it comprises:

- 10 (1) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region and a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus,
- (2) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from interleukin-2,
- 15 (3) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from the molecule B7.1,
- (4) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region of a papillomavirus, a polypeptide derived from the molecule B7.1 and a polypeptide derived from interleukin-2,
- 20 (5) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region, a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from interleukin-2,
- 25 (6) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region, a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus and a polypeptide derived from the molecule B7.1, or
- 30 (7) a polypeptide from the E6 region, a polypeptide from the E7 region, a polypeptide from the L1 region, a polypeptide from the L2 region of a papillomavirus, a polypeptide derived from the molecule B7.1 and a polypeptide derived from interleukin-2.

9. Pharmaceutical composition according to one of  
35 Claims 1 to 8, characterized in that the papillomavirus is selected from the HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 and/or HPV-45 types.

10. Pharmaceutical composition intended for the treatment or prevention of a papillomavirus infection or

tumor, which comprises, as therapeutic agent(s), one or more recombinant vectors into which there are inserted DNA fragments coding for:

- 5 (1) at least one polypeptide from the early region of a papillomavirus and at least one polypeptide from the late region of a papillomavirus,
- (2) at least one polypeptide from the early region of a papillomavirus, at least one polypeptide from the late region of a papillomavirus and at least one
- 10 polypeptide having an immunostimulatory activity, or
- (3) at least one polypeptide from an early or late region of a papillomavirus and at least one polypeptide having an immunostimulatory activity;

15 said DNA fragments being placed under the control of the elements necessary for their expression in a host cell or organism.

11. Pharmaceutical composition according to Claim 10, characterized in that said polypeptides have the characteristics defined in Claims 2 to 9.

20 12. Pharmaceutical composition according to Claim 10 or 11, characterized in that the recombinant vector is a viral vector which can be derived from the genome of a virus selected from poxviruses, adenoviruses, retroviruses, herpesviruses and adeno-associated viruses.

25 13. Pharmaceutical composition according to Claim 12, characterized in that the recombinant vector is derived from a poxvirus selected from the group consisting of vaccinia virus, canarypox virus and fowlpox virus.

30 14. Pharmaceutical composition according to Claim 13, characterized in that the recombinant vector is derived from a vaccinia virus selected from the Copenhagen, Wyeth and modified Ankara (MVA) strains.

15. Pharmaceutical composition according to Claim 13 or 14, characterized in that the elements essential for

35 the expression of the DNA fragments coding for said polypeptides comprise a promoter of a gene of a vaccinia virus selected from the promoters of the thymidine kinase (TK), 7.5K, H5R and K1L genes.

16. Pharmaceutical composition according to Claim 14

or 15, characterized in that the recombinant vector is derived from a vaccinia virus of the Copenhagen strain and in that the DNA fragments coding for said polypeptides are inserted into the TK locus and/or the K1L locus of said vaccinia virus.

17. Pharmaceutical composition according to Claim 14 or 15, characterized in that the recombinant vector is derived from a vaccinia virus of the MVA strain and in that the DNA fragments coding for said polypeptides are inserted at the level of any of the excision zones selected from the I, II, III, IV, V and VI excisions of said vaccinia virus.

18. Pharmaceutical composition according to one of Claims 10 to 17, intended for the treatment or prevention of a papillomavirus infection or tumor, characterized in that it comprises one or more recombinant vectors derived from the Copenhagen or MVA strain of a vaccinia virus into which there are inserted:

- (1) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for the molecule B7.1,
- (2) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for interleukin-2,
- (3) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the molecule B7.1 and a DNA fragment coding for interleukin-2,
- (4) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus,
- (5) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7

protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for the molecule B7.1,

5

(6) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for interleukin-2, or

10

(7) a DNA fragment coding for the E6 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the E7 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the molecule B7.1 and a DNA fragment coding for interleukin-2.

15

19. Pharmaceutical composition according to one of Claims 10 to 17, intended for the prevention of a papillomavirus infection or tumor, characterized in that it comprises one or more recombinant vectors derived from the Copenhagen or MVA strain of a vaccinia virus, into which there are inserted:

25

(1) a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for the molecule B7.1,

30

(2) a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus and a DNA fragment coding for interleukin-2, or

35

(3) a DNA fragment coding for the L1 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for the L2 protein of a papillomavirus, a DNA fragment coding for interleukin-2 and a DNA fragment coding for the molecule B7.1.

20. Pharmaceutical composition according to one of

21. Pharmaceutical composition according to one of Claims 1 to 20, characterized in that it comprises a pharmaceutically acceptable carrier allowing its administration by injection into humans or into animals.

22. Pharmaceutical composition according to one of Claims 1 to 21, as a medicament for the treatment or prevention of cancer of the neck of the uterus, of a dysplasia of the neck of low grade and of a papilloma-virus infection.

1/3

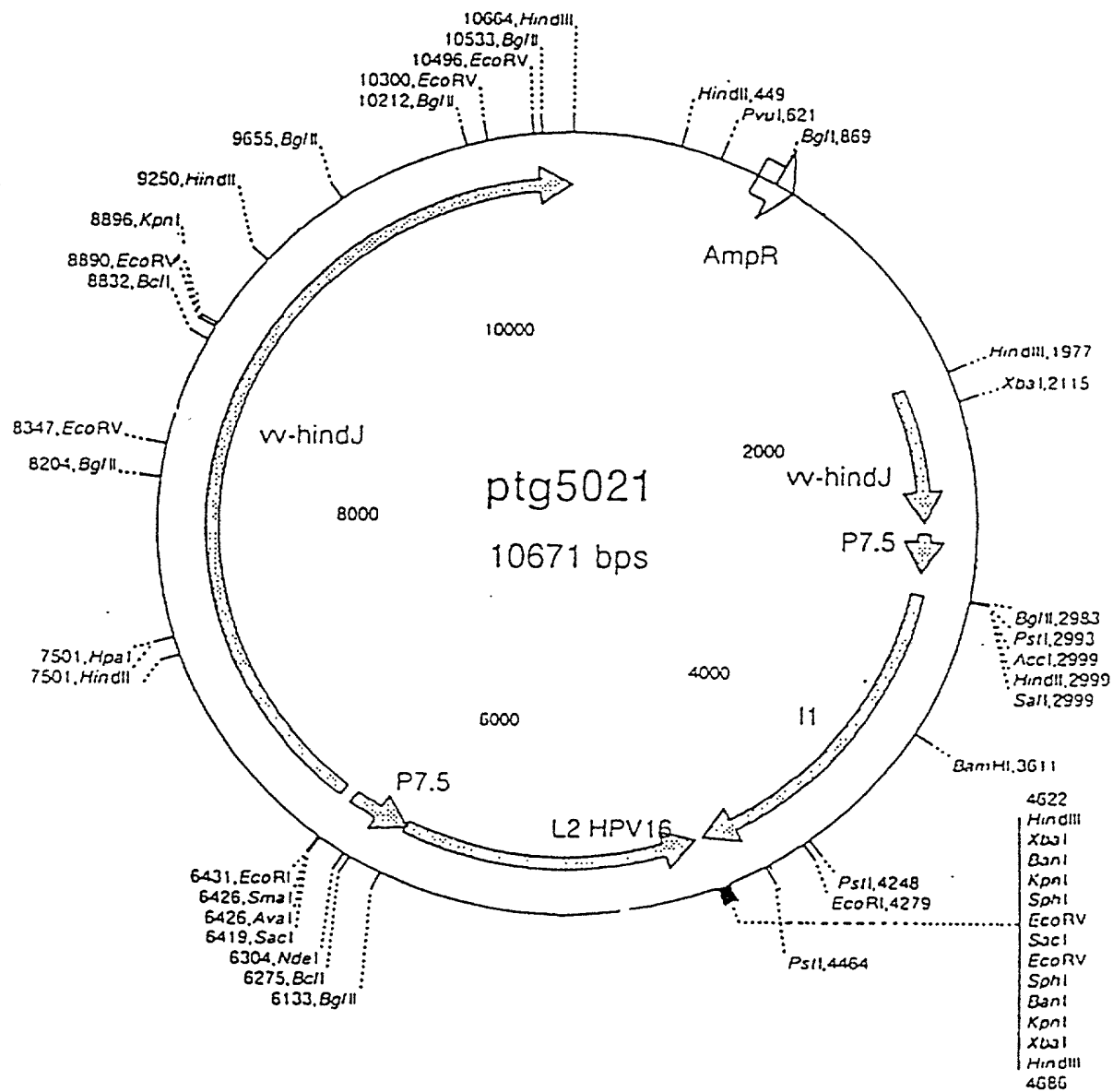


FIG. 1

2/3

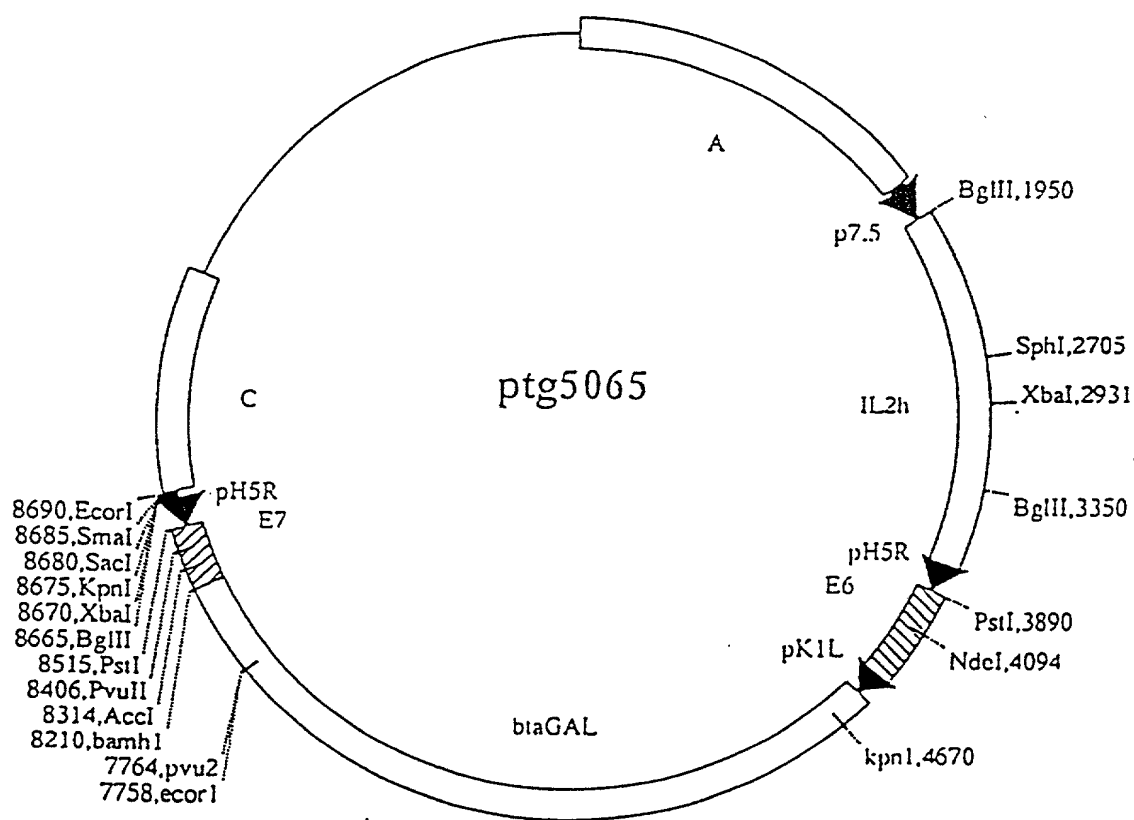


FIG. 2

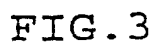
[illegible]

FIG. 3



COMBINED DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY  
FOR UTILITY PATENT APPLICATION

Attorney's Docket No.

As a below-named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name;

I BELIEVE I AM THE ORIGINAL, FIRST AND SOLE INVENTOR (if only one name is listed below) OR AN ORIGINAL, FIRST AND JOINT INVENTOR (if more than one name is listed below) OF THE SUBJECT MATTER WHICH IS CLAIMED AND FOR WHICH A PATENT IS SOUGHT ON THE INVENTION ENTITLED:

PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING PAPILLOMAVIRUS TUMORS AND  
INFECTION

the specification of which

(check one)

☐

is attached hereto;

☒

was filed on July 29, 1997 as

International Application No. PCT/FR97/01412

and was amended on \_\_\_\_\_;  
(if applicable)

I HAVE REVIEWED AND UNDERSTAND THE CONTENTS OF THE ABOVE-IDENTIFIED SPECIFICATION, INCLUDING THE CLAIMS, AS AMENDED BY ANY AMENDMENT REFERRED TO ABOVE;

I ACKNOWLEDGE THE DUTY TO DISCLOSE TO THE OFFICE ALL INFORMATION KNOWN TO ME TO BE MATERIAL TO PATENTABILITY AS DEFINED IN TITLE 37, CODE OF FEDERAL REGULATIONS, Sec. 1.56 (as amended effective March 16, 1992);

I do not know and do not believe the said invention was ever known or used in the United States of America before my or our invention thereof, or patented or described in any printed publication in any country before my or our invention thereof or more than one year prior to said application; that said invention was not in public use or on sale in the United States of America more than one year prior to said application; that said invention has not been patented or made the subject of an inventor's certificate issued before the date of said application in any country foreign to the United States of America on any application filed by me or my legal representatives or assigns more than twelve months prior to said application;

I hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code Sec. 119 and/or Sec. 365 of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate as indicated below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate on this invention having a filing date before that of the application(s) on which priority is claimed:

# COMBINED DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY

Attorney's Docket No.

017753-077

COUNTRY/INTERNATIONAL	APPLICATION NUMBER	DATE OF FILING (day, month, year)	PRIORITY CLAIMED
FRANCE	96 09584	30.07.96	YES <u>X</u> NO <u>  </u>
INTERNATIONAL	PCT/FR97/01412	29.07.1997	YES <u>X</u> NO <u>  </u>

I hereby appoint the following attorneys and agent(s) to prosecute said application and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith and to file, prosecute and to transact all business in connection with international applications directed to said invention:

William L. Mathis	17,337	Ralph L. Freeland, Jr.	16,110	William C. Rowland	30,888
Peter H. Smolka	15,913	Robert G. Mukai	28,531	T. Gene Dillahunty	25,423
Robert S. Swecker	19,885	George A. Hovanec, Jr.	28,223	Anthony W. Shaw	30,104
Platon N. Mandros	22,124	James A. LaBarre	28,632	Patrick C. Keane	32,858
Benton S. Duffett, Jr.	22,030	E. Joseph Gess	28,510	Bruce J. Boggs, Jr.	32,344
Joseph R. Magnone	24,239	R. Danny Huntington	27,903	William H. Benz	25,952
Norman H. Stepno	22,716	Eric H. Weisblatt	30,505	Peter K. Skiff	31,917
Ronald L. Grudziecki	24,970	James W. Peterson	26,057	Richard J. McGrath	29,195
Frederick G. Michaud, Jr.	26,003	Teresa Stanek Rea	30,427	Matthew L. Schneider	32,814
Alan E. Kopecki	25,813	Robert E. Krebs	25,885	Michael G. Savage	32,596
Regis E. Sluter	26,999	Robert M. Schulman	31,196	Gerald F. Swiss	30,113
Samuel C. Miller, III	27,360				

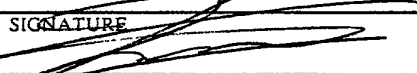
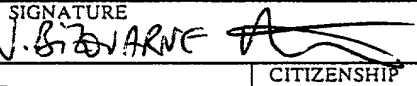
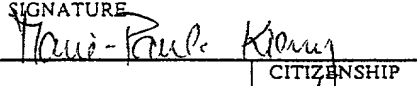
and:

Address all correspondence to:

Norman H. Stepno  
Burns, Doane, Swecker & Mathis, LLP  
P.O. Box 1404  
Alexandria, Virginia 22313-1404

Address all telephone calls to: Norman H. Stepno at (703) 836-6620.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

FULL NAME OF SOLE OR FIRST INVENTOR <b>BALLOUL Jean-Marc</b>		SIGNATURE 	DATE March 3, 1998
RESIDENCE 12 rue des Alouettes - 67380 Lingolsheim / Fr		CITIZENSHIP France	
POST OFFICE ADDRESS The same as residence			
FULL NAME OF SECOND JOINT INVENTOR, IF ANY <b>BIZOUARNE Nadine</b>		SIGNATURE 	DATE March 3, 1998
RESIDENCE 5 rue de Mutzig - 67300 Schiltigheim / Fr		CITIZENSHIP France	
POST OFFICE ADDRESS The same as residence			
FULL NAME OF THIRD JOINT INVENTOR, IF ANY <b>KIENY Marie-Paule</b>		SIGNATURE 	DATE March 3, 1998
RESIDENCE 6 allée des Platanes - 67100 Strasbourg / Fr		CITIZENSHIP France	
POST OFFICE ADDRESS The same as residence			

# SEQUENCE LISTING

<110> BALLOUL, Jean-Marc  
BIZOUARNE, Nadine  
KIENY, Marie-Paule

<120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING PAPILLOMA VIRUS  
TUMORS AND INFECTION

<130> 017753-094

<140> 09/043,933

<141> 1998-03-30

<150> PCT/FR97/01412

<151> 1997-07-29

<150> FR 96 09584

<151> 1996-07-30

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Human papillomavirus

<400> 1

tctgagctgt catttaattg agttgtctct ggttgc

36

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Human papillomavirus

<400> 2

tgtccagatg tctttgcagt ggcttttgac ag

32

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tcagcccctg aattctgcgg acactgttat acagg

35

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ttgaccctaa agatctgaag ccatgggccca cac 33

<210> 5  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Vaccinia virus

<400> 5  
gggggggaat tcagtaaact tgactaaatc tt 32

<210> 6  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Vaccinia virus

<400> 6  
ggggggggat ccgagctcac cagccaccga aagagcaat 39

<210> 7  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Vaccinia virus

<400> 7  
ggggggggat ccggaaagtt ttataggtag tt 32

<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Vaccinia virus

<400> 8  
gggggggaat tctttgtatt tacgtgaacg 30

<210> 9  
<211> 78  
<212> DNA  
<213> Vaccinia virus

<400> 9  
cttatacagg gcgtacactt tcccttctca atctctctcg agttgtattt attttcattt 60  
tttaagtata gaataaaa 78

<210> 10  
<211> 86  
<212> DNA  
<213> Vaccinia virus

<400> 10  
agctttttat tctatactta aaaaatgaaa ataaatacaa ctcgagagag attgagaagg 60  
gaaagtgtac gccctgtata aggtac 86

<210> 11  
<211> 39  
<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 11

atggtaccga attccatcta ccaattcatc caacaacat

39

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 12

ggctgcagga tccgagctca tcatgacgtc ctctgcaatg g

41

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 13

ggggggggat cctgtgaatc atccattcca ct

32

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 14

gggggggaat tegtactaa attgcaagga aat

33

<210> 15

<211> 69

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 15

ctcaagtcag tgttgagatg atgctttgac aactcgagtt tattttcatt ttttaagtat 60  
agaataaaa 69

<210> 16

<211> 77

<212> DNA

<213> Vaccinia virus

<400> 16

agctttttat tctatactta aaaaatgaaa ataaactcga gttgtcaaag catcatctca 60  
aactgactt gaggtac 77

**Composition pharmaceutique  
contre les tumeurs et infections à papillomavirus**

5

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique destinée au traitement ou la prévention des lésions associées aux papillomavirus et plus particulièrement aux papillomavirus humains (HPV) de type 16, 18, 31, 33 et 45.

10

Les papillomavirus sont des virus à ADN possédant un génome circulaire d'environ 7900 paires de bases entouré par une capsidie protéique. Un certain nombre de types de papillomavirus bovins (BPV), humains (HPV) ont été identifiés et leur génome séquencé (Pfister, 1987, in *The papovaviridae : The Papillomaviruses* (édition Salzman et Howley) Plenum Press, New York, p 1-38).

15

Il comprend une région précoce et une région tardive. La région tardive contient deux cadres de lecture L1 et L2 qui codent pour les composants majeurs de la capsidie. La région précoce contient au moins les cadres de lecture E1, E2, E4, E5, E6 et E7. Les produits d'expression E1 et E2 régulent la réplication virale et l'expression des gènes viraux alors que ceux des régions E5, E6 et E7 sont impliqués dans les processus de transformation oncogénique des cellules infectées. En effet, il a été montré expérimentalement que la protéine E5 de BPV-1 peut *in vitro* transformer des cellules (Schlegel et al., 1986, Science 233, 464-467). Les protéines E6 de BPV-1 et E7 de HPV-16 sont impliquées dans l'induction et le maintien de la transformation oncogène. Le pouvoir transformant de E7 a été démontré pour HPV-16 et HPV-18 (Kanda et al., 1988, J. Virol. 62, 610-613 ; Vousden et al., 1988, Oncogene Res. 3, 1-9 ; Bedell et al., 1987, J. Virol. 61, 3635-3640). Il n'a pas été mis en évidence de fonction à E4.

25

Chez l'homme, les HPV sont associés à des pathologies allant de l'infection bénigne de la peau aux verrues et aux tumeurs malignes. Ces virus sont hautement spécifiques des épithélium de l'épiderme des voies génitales, orales et respiratoires. Les données épidémiologiques suggèrent fortement le rôle de certaines souches

30

dans le cancer du col de l'utérus et des voies basses, en particulier les HPV-16 et 18 et à un moindre degré les HPV-31, 33 et 45. Le cancer du col utérin est la deuxième cause de cancer féminin dans le monde. Selon l'OMS, 460000 nouveaux cas sont répertoriés chaque année dont 200000 cas au moins sont clairement associés aux HPV. Toute une série d'études démontre le rôle transformant de ces virus, leur intégration spécifique dans le génome des cellules néoplasiques, leur activité génique dans les cellules cancéreuses et l'importance de l'expression des gènes précoces E6 et E7 dans le maintien du phénotype malin des cellules néoplasiques HPV positives (Monsenego, J. Impact Medecin, 11 mars 1994).

Les pathologies associées aux virus HPV posent un problème thérapeutique du fait de leur nature persistante et récurrente. De nombreuses approches ont déjà été utilisées dans le traitement de ces maladies comme la chirurgie, la chimiothérapie, les agents antiviraux et l'immunothérapie.

A cet égard, le brevet européen EP 0 462 187 décrit une approche de vaccination utilisant les gènes précoces des papillomavirus pour établir une immunité à l'égard des tumeurs résultant de l'intégration du génome HPV dans l'ADN cellulaire et dans lesquelles les protéines de la capsid ne sont plus exprimées. La demande WO 93/02184 enseigne une approche thérapeutique basée sur l'utilisation des antigènes de capsid à titre d'agents immunogènes. Ces documents ne suggèrent pas la possibilité d'associer l'effet préventif procuré par les polypeptides précoces et l'effet curatif conféré par les polypeptides tardifs des papillomavirus pour générer des compositions adaptées à l'ensemble des pathologies graves dues aux HPV. Par ailleurs, au cours des dernières années, il a été proposé d'utiliser des polypeptides ayant une activité immunostimulatrice dans le but d'activer les cellules T avec un résultat plus ou moins bénéfique selon les pathologies ciblées (voir par exemple WO 96 / 11279).

La présente invention concerne plus précisément une préparation basée sur un mélange d'antigènes originaires des régions précoces et tardives d'un papillomavirus ou un vecteur les exprimant simultanément, dans le but d'établir une immunité durable à l'encontre des cellules infectées. Les candidats vaccins proposés dans le cadre de la présente invention peuvent être utilisés à titre préventif

- 3 -

(immunoprophylaxie) pour limiter le développement ou la propagation de l'infection virale aux tissus voisins ou à titre curatif (immunothérapie) pour empêcher ou réduire une évolution tumorale chez les patientes infectées. L'utilisation des antigènes de capsid va induire la production d'anticorps contre les épitopes antigéniques localisés à la surface des particules virales empêchant l'infection de s'établir durablement. L'usage des protéines précoces va permettre d'induire une immunité à l'encontre des cellules infectées après intégration de l'ADN viral.

La présente invention fournit également une préparation associant un polypeptide originaire d'un papillomavirus et une molécule immunostimulatrice. Un des avantages d'une telle composition est qu'elle combine l'immunité spécifique induite par les antigènes viraux et l'immunité aspécifique induite par la molécule immunostimulatrice et destinée à renforcer la réponse spécifique.

Le but de la présente invention est de mettre à la disposition du public des compositions pharmaceutiques permettant le traitement des infections à HPV et plus particulièrement les pathologies graves telles que le cancer du col de l'utérus, d'une efficacité améliorée par rapport aux compositions de l'art antérieur.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus qui comprend à titre d'agents thérapeutiques

- (1) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus et au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus,
- (2) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus, au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice, ou
- (3) au moins un polypeptide originaire d'une région précoce ou tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice.

D'une manière générale, le terme polypeptide fait référence à tout ou partie



- 4 -

du polypeptide natif, à un polypeptide chimère résultant de la fusion de séquences d'origines différentes ou à un variant caractérisé par au moins une mutation (délétion, insertion et/ou substitution) d'un acide aminé. De manière plus particulière, un polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention a

5 notamment une séquence en acides aminés dont le degré de similarité avec la séquence de la protéine native est supérieur à 75 %, avantageusement, supérieur à 85 % et, de préférence, supérieur à 95 %. Le degré de similarité peut être aisément calculé à l'aide d'un programme ordinateur approprié ou en alignant les

10 le nombre de positions dans lesquelles les acides aminés des deux séquences se retrouvent à l'identique par rapport au nombre total de positions. La séquence des génomes de HPV-16 et de HPV-18 est divulguée dans Genebank aux numéros d'accension K02718 et X05015 respectivement.

Comme rappelé précédemment, le génome des virus de la famille des

15 papillomavirus, en particulier BPV et HPV, code pour au moins 8 polypeptides, deux polypeptides tardifs L1 et L2 composant la capside virale et 6 polypeptides précoces (E1, E2, E4, E5, E6 et E7) impliqués dans la régulation, le maintien du génome viral et la transformation des cellules infectées.

Bien que l'ensemble des protéines précoces d'un papillomavirus puisse être

20 utilisé dans le cadre de la présente invention, on choisit avantageusement de mettre en oeuvre un polypeptide dérivé de la protéine E6, de la protéine E7 ou des protéines E6 et E7. Il peut être avantageux d'avoir recours à un variant non oncogène muté au niveau des régions impliquées dans le processus de transformation des cellules infectées. De tels variants sont décrits dans la littérature

25 (Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105 ; Crook et al., 1991, Cell 67, 547-556 ; Heck et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4442-4446 ; Phelps et al., 1992, J. Virol. 66, 2418-2427).

Un polypeptide préféré originaire de la région tardive d'un papillomavirus dérive de la protéine L1, de la protéine L2 ou des protéines L1 et L2.

30 Selon les modes de réalisation (2) et (3) particulièrement avantageux, une composition selon l'invention comprend également un polypeptide ayant une

activité immunostimulatrice. Par "immunostimulatrice", on entend la capacité à stimuler une réponse immunitaire humorale en activant les lymphocytes B afin d'amplifier la production d'anticorps dirigés contre les antigènes de papillomavirus ou à stimuler une réponse immunitaire à médiation cellulaire en activant les lymphocytes T afin de déclencher une réponse cytotoxique significative à l'encontre de cellules tumorales ou infectées par un papillomavirus. A titre indicatif, l'immunostimulation peut être évaluée en modèle animal (par comparaison du taux de rejet dans un animal auquel on a greffé une tumeur exprimant l'antigène cible, ceci en présence et en absence de l'immunostimulateur). D'une manière plus générale, les moyens pour mettre en évidence une immunostimulation sont indiqués dans Roitt (in *Immunology*, 4th edition, Moby Ltd).

On peut utiliser une molécule immunostimulatrice native telle que trouvée dans un mammifère et, en particulier chez l'homme, une partie de celle-ci, une molécule chimérique provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou un mutant, à la condition toutefois de conserver la fonction immunostimulatrice. Parmi toutes les molécules envisageables, on préférera mettre en oeuvre un polypeptide constitué par ou dérivé de l'interleukine-2, de l'interleukine-7, de l'interleukine-12 et des molécules de co-adhésion B7.1 et B7.2, l'interleukine-2 et la molécule B7.1 étant particulièrement préférées dans le cadre de la présente invention.

Une composition préférée selon l'invention comprend :

- (1) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1 et un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus,
- (2) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,
- (3) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de la molécule B7.1,
- (4) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la

région E7 d'un papillomavirus, un polypeptide dérivé de la molécule B7.1 et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,

(5) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,

(6) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de la molécule B7.1, ou

(7) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus, un polypeptide dérivé de la molécule B7.1 et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2.

Etant donné les observations rappelées plus haut sur la fréquence d'infection par certains types d'HPV dans les cas de cancer du col de l'utérus, une composition selon l'invention comprend un polypeptide originaire d'un papillomavirus à risque, de type HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 et/ou HPV-45 et en particulier du virus HPV-16. Bien entendu, dans le cas où la composition inclut plusieurs antigènes de papillomavirus, ceux-ci peuvent être d'une origine commune ou différente.

D'une manière générale, un polypeptide originaire d'un papillomavirus ou ayant une activité immunostimulatrice peut être produit par les méthodes conventionnelles de synthèse chimique ou bien par les techniques de l'ADN recombinant (voir par exemple Maniatis et al., 1989, *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Plus particulièrement, un procédé de préparation comprend l'acte de cultiver une cellule transformée par un fragment d'ADN codant pour le polypeptide en question pour générer une cellule productrice et l'acte de récolter ledit polypeptide à partir de la culture. La cellule productrice peut être d'une origine quelconque et sans limitation, une bactérie, une levure ou bien une cellule de mammifère, dans la mesure où le

fragment d'ADN considéré est soit intégré dans son génome soit intégré dans un vecteur d'expression approprié capable de se répliquer. Bien entendu, le fragment d'ADN est placé sous le contrôle de signaux de transcription et de traduction permettant son expression dans la cellule productrice. Vecteurs d'expression et  
5 signaux de contrôle sont connus de l'homme du métier.

La présente invention vise également une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus qui comprend à titre d'agent(s) thérapeutique(s) un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dans le(s)quel(s) sont insérés des fragments d'ADN  
10 codant pour :

- (1) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus et au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus,
- (2) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus, au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice, ou  
15
- (3) au moins un polypeptide originaire d'une région précoce ou tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice ;  
20

lesdits fragments d'ADN étant placés sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte.

Selon cette alternative par ailleurs préférée, l'agent thérapeutique est un vecteur dans lequel sont insérés les fragments d'ADN codant pour les polypeptides  
25 originaires d'un papillomavirus ou immunostimulateurs tels que définis précédemment. Ce type de composition présente l'avantage d'une production bon marché et d'une grande stabilité dans des conditions d'environnement variées. En particulier, les conditions de conservation sont moins contraignantes.

Les fragments d'ADN codant pour un polypeptide originaire d'un papillomavirus peuvent être obtenus par clonage, par PCR (Polymerase Chain Réaction) ou par synthèse chimique selon les techniques conventionnelles  
30

communément en usage à partir de cellules papillomavirus positives obtenues de patients ou de collections.

Le gène codant pour un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice peut également être isolé selon les techniques standards à partir du génome d'une cellule (type génomique) ou des ARN messagers d'une cellule dans laquelle il est exprimé (type ADN complémentaire). Par ailleurs, le gène en question peut coder pour (i) une molécule soluble, soit intracellulaire soit sécrétée dans le milieu extérieur ou (ii) une molécule ancrée dans la membrane et donc présente à la surface des cellules qui l'expriment.

Un vecteur recombinant préféré dans le cadre de l'invention est un vecteur viral dans le génome duquel ont été insérés les fragments d'ADN précités de manière à permettre leur transfert et leur expression dans une cellule ou un organisme hôte. Un vecteur viral pouvant être mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention, peut être dérivé notamment d'un poxvirus, d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus de l'herpès ou d'un virus associé à l'adénovirus. Avantageusement, il s'agira d'un vecteur non-intégratif et d'une virulence atténuée. De tels vecteurs ainsi que leurs techniques de préparation sont connus de l'homme de l'art.

Dans le cas où l'on met en oeuvre un vecteur adénoviral, on aura de préférence recours à un vecteur non répliatif par délétion de régions essentielles à la répliation et, notamment, de la majorité de la région E1 afin d'éviter sa propagation au sein de l'organisme hôte ou l'environnement. Il va de soi que l'on peut modifier ou déléter d'autres régions du génome adénoviral, dans la mesure où les fonctions essentielles défectives sont complétées en *trans*. Un vecteur adénoviral préféré selon l'invention retiendra les séquences essentielles à l'encapsulation, à savoir les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsulation. Les différents vecteurs adénoviraux ainsi que leurs techniques de préparation sont conventionnels et sont décrits dans Graham et Preveet (1991, in *Methods in Molecular Biology*, vol 7, p 109-128 ; Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc.) et la demande internationale WO 94/28152. S'il

s'agit d'un rétrovirus, on conserve les LTRs (Long Terminal Repeat) et les séquences d'encapsidation (voir par exemple Naviaux et Verma, 1992, Current Opinion in Biotechnology 3, 540-547).

5 Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur viral recombinant selon l'invention dérive d'un poxvirus et, notamment, d'un poxvirus aviaire, tel que le poxvirus du canari, d'un fowlpox ou d'un virus de la vaccine, ce dernier étant préféré. Parmi tous les virus de la vaccine envisageables dans le cadre de la présente invention, on choisit de préférence les souches Copenhague, Wyeth et Ankara modifiée (MVA pour Modified Vaccinia Virus Ankara). Les conditions  
10 générales d'obtention d'un virus de la vaccine capable d'exprimer un gène hétérologue sont enseignées dans le brevet européen EP 83 286 et la demande EP 206 920. Quant au virus MVA, il est plus particulièrement décrit dans (Mayr et al., 1975, Infection 3, 6-14 ; Sutter et Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10847-10851).

15 Bien entendu, dans le cadre de la présente invention, les fragments d'ADN sont placés sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression. Ceux-ci incluent les éléments appropriés de régulation de la transcription ainsi que des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction. Le promoteur revêt une importance particulière. D'une façon générale, on aura recours à un  
20 promoteur fonctionnel dans l'organisme ou la cellule hôte que l'on veut traiter et adapté au vecteur employé. En outre, il peut être modifié de manière à contenir des séquences régulatrices, par exemple un élément activateur de la transcription ou des séquences répondant à certains signaux cellulaires. A cet égard, il peut être avantageux d'utiliser un promoteur tissu-spécifique puisque  
25 les lésions associées aux papillomavirus sont localisées au niveau des voies génitales ou un promoteur répondant à des signaux spécifiquement tumoraux (par exemple activé en présence de facteurs de croissance généralement surexprimés par les cellules tumorales) afin de limiter l'expression aux seules cellules tumorales.

30 Parmi les promoteurs envisageables dans le cadre de l'invention, on peut

citer les promoteurs SV40 (Virus Simian 40), HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl-coenzyme A), TK (Thymidine Kinase), CMV (cytomégalo virus), RSV (Rous Sarcoma Virus), le MLP (Major Late Promoter) de l'adénovirus adaptés au vecteur adénoviraux et le LTR du Mo-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) plus spécifiques aux vecteurs rétroviraux. Lorsque le vecteur dérive d'un poxvirus, de préférence le promoteur sera le promoteur d'un gène du poxvirus utilisé, par exemple le promoteur du gène codant pour la protéine 7,5K, H5R, TK ou K1L du virus de la vaccine. Ces derniers sont décrits dans la littérature et peuvent être clonés à partir du génome viral par les techniques classiques.

Par ailleurs, les éléments nécessaires à l'expression peuvent également comporter des séquences améliorant l'expression ou le maintien dans la cellule hôte (intron, séquence signal, séquence terminatrice de la transcription, site d'initiation de la traduction, séquences modifiant la présentation du polypeptide aux cellules du système immunitaires de l'hôte....). Cependant, s'agissant d'un vecteur dérivé d'un poxvirus, on évitera l'emploi d'introns.

Une composition selon l'invention peut être obtenue soit avec plusieurs vecteurs recombinants exprimant chacun un polypeptide donné soit avec un seul vecteur exprimant les fragments d'ADN correspondant aux polypeptides choisis placés sous le contrôle d'éléments indépendants ou communs. Selon cette dernière option, on peut avoir recours à des séquences permettant d'initier la traduction de manière interne (IRES) ou à des fusions en phase des différents gènes.

Les conditions générales d'obtention d'un vecteur recombinant en usage dans la présente invention sont largement décrits dans l'état de la technique. S'agissant d'un vecteur poxviral, on peut se référer au brevet européen EP 83 286 dont le contenu est ici incorporé par référence. Ces conditions sont applicables aux autres virus acceptables comme vecteur qui possèdent une région génomique non essentielle dans laquelle les blocs d'expression peuvent être incorporés. Bien entendu, ils peuvent être insérés dans le même locus ou un locus différent. Par exemple, lorsque l'on utilise un virus de la vaccine de la

souche Copenhague, le site d'insertion préféré est le locus TK et/ou le locus K1L. L'insertion au niveau du gène viral TK a pour effet d'inactiver celui-ci et ainsi faciliter la sélection des recombinants. Dans le cadre d'un virus de la vaccine de la souche MVA, l'insertion des gènes de papillomavirus et immunostimulateurs  
5 peut être réalisée au sein d'une des excisions I à VI et, de préférence, la zone d'excision II ou III (Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 ; Sutter et al., 1994, Vaccine 12, 1032-1040).

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un vecteur recombinant peut en outre comprendre un bloc d'expression d'un gène  
10 marqueur de sélection afin de faciliter les étapes d'isolement et de purification du virus recombinant. On peut citer notamment le gène *Neo* conférant la résistance à l'antibiotique G418, le gène *pac* de résistance à la puromycine, le gène TK du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) qui confère la sensibilité à certains analogues de nucléosides tels que le ganciclovir ou  
15 l'acyclovir, les gènes bactériens *LacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase et *gus A* codant pour la  $\beta$ -glucuronidase. Ces deux derniers marqueurs enzymatiques permettent de repérer les virus recombinants par coloration en présence des substrats X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) et XglcA (5-bromo-6-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoronide) respectivement.

20 Une composition pharmaceutique selon l'invention en vue du traitement ou la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus, comprend un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dérivé(s) d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans le(s)quel(s) sont insérés :

- 25 (1) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- (2) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2,
- 30 (3) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un



fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1 et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2,

- 5 (4) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus,
- 10 (5) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- 15 (6) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2, ou
- 20 (7) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1 et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2.

En revanche, une composition pharmaceutique selon l'invention plus particulièrement destinée à des fins d'immunoprophylaxie, comprend un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dérivé(s) d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans le(s)quel(s) sont insérés :

- 25 (1) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus et un
- 30 fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- (2) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un

fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2, ou

- (3) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus, un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus, un  
5 fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2 et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1.

Une composition selon l'invention peut être préparée selon les procédés connus dans le domaine des vaccins et les doses applicables peuvent varier dans une large gamme. Elles sont fonctions notamment des polypeptides et du virus  
10 employés, de la pathologie à traiter, de l'état du patient et d'autres paramètres qui peuvent être évalués par le clinicien. Cependant, en général, la dose de virus par kilo sera de  $10^4$  à  $10^{11}$ , avantageusement de  $10^6$  à  $10^{10}$  et, de préférence de  $10^7$  à  $10^9$  unités formant des plages (ufp) lorsque l'agent thérapeutique est un vecteur viral et de 0,05 à 500 mg, avantageusement de 0,5 à 200 mg et, de préférence de  
15 1 à 100 mg lorsque l'agent thérapeutique est d'origine polypeptidique.

Une composition selon l'invention peut être administrée selon n'importe quelle voie conventionnelle d'administration, en particulier par voie intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée ou sous-épithéliale ou bien par scarification. Dans le cas d'une tumeur accessible, il est également possible de recourir à une injection  
20 directe dans le site ou à proximité de la tumeur ou à une application topicale. A titre de vaccin, une composition selon l'invention peut être administrée selon les pratiques courantes dans le domaine, par exemple en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Par contre dans le cadre d'un traitement curatif, elle peut être administrée fréquemment pendant une période  
25 suffisante pour que le traitement soit efficace. Lorsque l'agent thérapeutique est un vecteur viral, ce virus est de préférence sous forme vivante. S'agissant d'un vecteur poxviral, on préférera employer une souche atténuée comme la souche MVA ou la souche Copenhague thymidine kinase négative. Enfin un vecteur viral recombinant peut être atténué par un traitement chimique approprié connu de  
30 l'homme du métier. Toutefois, on peut aussi envisager d'injecter un vecteur recombinant tué.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur recombinant en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Le support est choisi de manière à permettre son administration  
5 par injection à l'homme ou à l'animal. Elle peut également comprendre un véhicule, un diluant et/ou un adjuvant et se présenter sous forme liquide ou lyophilisée.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention, à titre de médicament pour le traitement ou la prévention du cancer du col de l'utérus, d'une dysplasie du col de bas grade et d'une infection à  
10 papillomavirus.

Enfin, la présente invention a également trait à une méthode de traitement ou de prévention des pathologies citées ci-dessus, selon laquelle on administre à un individu ayant besoin d'un tel traitement une quantité efficace d'un point de vue pharmaceutique d'un mélange de polypeptide ou d'un vecteur recombinant en usage  
15 dans la présente invention.

La présente invention est illustrée par référence aux Figures suivantes.

La Figure 1 est une représentation schématique du vecteur pTG5021 permettant le transfert au locus TK de la vaccine Copenhagen des gènes tardifs L1 et L2 de HPV-16 placés sous le contrôle du promoteur p7,5K, les deux cassettes  
20 étant en orientation opposée l'une par rapport à l'autre.

La Figure 2 est une représentation schématique du vecteur pTG5065 permettant le transfert au locus K1L de la vaccine Copenhagen des gènes précoces E6 et E7 de HPV-16 placés sous le contrôle du promoteur pH5R (les deux cassettes étant en orientation opposée l'une par rapport à l'autre), du gène IL-2  
25 humain (IL2h) placé sous le contrôle du promoteur p7,5K et du gène marqueur LacZ (btaGAL) placé sous le contrôle du promoteur pK1L.

La Figure 3 illustre de manière schématique la stratégie qui peut être employée pour introduire les gènes tardifs L1 et L2 de HPV-16 au sein de la zone d'exclusion II d'un virus de la vaccine MVA, les bras de recombinaison gauche et  
30 droit étant indiqués (BRG2 et BRD2) respectivement.

## EXEMPLES

La présente invention est plus complètement décrite, sans pour autant être limitée, à l'aide des exemples suivants.

- 5 Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, *supra*) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. La mutagenèse dirigée *in vitro* par oligonucléotides synthétiques est effectuée à l'aide du kit distribué par Amersham. Les techniques d'amplification
- 10 par PCR sont connues de l'homme de l'art (voir par exemple PCR Protocols-A guide to methods and applications, 1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc). S'agissant de la réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow).
- 15 Les étapes de clonage, les bactériophages M13 recombinants sont multipliés sur la souche *E. coli* NM522 (Stratagène) dans un milieu minimum gélosé (agar 7,5 %) ou dans un milieu riche LBM liquide. Les plasmides recombinants portant le gène de résistance à l'ampicilline sont repliqués dans les souches *E. coli* C600 (Stratagène), BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580) et NM522 sur milieu gélosé ou liquide supplémenté de 100 µg/ml
- 20 d'antibiotique. On utilise préférentiellement la souche BJ5183 lorsque le clonage est effectué par recombinaison homologe (Bubeck et al., 1993, Nucleic Acid Res. 21, 3601-3602).

- La construction des virus de la vaccine recombinants est effectuée selon la
- 25 technologie classique dans le domaine divulguée dans les documents déjà cités et dans Mackett et al., (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) et Mackett et al. (1984, J. Virol. 49, 857-864).

- EXEMPLE 1 : Construction du virus de la vaccine Copenhagen
- 30 VVTG5021&5065 exprimant les gènes E6, E7, L1 et L2 du  
HPV-16 et le gène humain IL-2.

A. *Isolement des gènes L1 et L2 de HPV16*

Les fragments codant pour les protéines L1 et L2 sont isolés par PCR à partir d'ADN génomique de cellules Caski (ATCC 1550) selon les techniques  
5 générales de l'art. Le fragment d'amplification portant les séquences L1 est sous cloné dans le vecteur M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91-99), pour donner la construction M13TG8171. La séquence du gène L1 cloné révèle plusieurs mutations par rapport à la séquence contenue dans Genbank (accession K02718) : C à la place d'un A en position 248, C à la place d'un A en position 253,  
10 G à la place d'un A en position 537, G à la place d'un C en position 682, G à la place d'un A en position 874, insertion d'un triplet ACT en position 1393, délétion d'un triplet GAT en position 1390. L'insertion du fragment PCR portant les séquences L2 dans le vecteur M13TG6131 conduit à M13TG9126. On dénombre 5 mutations ponctuelles par rapport à la séquence divulguée dans Genbank : C à  
15 la place d'un T en position 378, A à la place d'un G en position 691, A à la place d'un G en position 702, G à la place d'un A en position 990 et C à la place d'un A en position 1092. A titre indicatif, le vecteur M13TG6131 dérive de M13TG131 (Kieny et al., 1983, *supra*) par mutation du site *Bgl*/II interne situé en dehors des sites multiples de clonage.

20

B. *Construction du vecteur pTG5021 pour le transfert des gènes L1 et L2 dans le locus TK du génome du virus de la vaccine*

Le gène codant pour la protéine L1 est modifié par création d'un site *Bgl*/II  
25 en amont de l'ATG initiateur. Le gène muté est excisé du vecteur précédent (M13TG8185) par digestion *Bgl*/II-*Sac*I et inséré entre les sites *Bam*HI et *Sac*I du pTG186-poly. La construction résultante est dénommée pTG4019. Le vecteur de transfert pTG186-poly est décrit en détail dans le brevet français 2 583 429. Il comporte 10 sites de restriction pour l'insertion du gène à transférer et le  
30 promoteur p7,5K pour le contrôle de son expression.

Le gène codant pour la protéine L2 est isolée de M13TG9126 par digestion

*Bgl*II-*Hind*III puis cloné entre les sites *Bam*HI et *Hind*III en 3' du promoteur 7,5K. On obtient M13TG9127 dans lequel on introduit par mutagenèse localisée un site *Sac*I en amont du promoteur. Le bloc d'expression "p7,5K-gène L2" est isolé du vecteur muté M13TG9129 et cloné dans le site *Sac*I du vecteur de transfert pTG4019 de telle manière que les deux cassettes p7,5K-L1 et p7,5K-L2 soient en orientation inverse. La construction ainsi obtenue pTG5021 est représentée à la Figure 1. Les blocs d'expression sont transférés dans le génome du virus de la vaccine souche Copenhagen par recombinaison homologue. Le virus recombinant désigné VVTG5021 est isolé par sélection au 5-bromodéoxyuridine (5BUDR)

C. *Isolement des gènes E6 et E7 de HPV16*

Les gènes E6 et E7 sont isolés à partir de la lignée cellulaire Caski comme décrit aux exemples 2 et 3 du brevet européen EP 0 462 187. Deux constructions ont été dérivées du clone M13E7/E6 contenant les gènes E6 et E7 du HPV-16 afin de faciliter les étapes ultérieures de clonage. La première désignée M13TG8188 résulte de l'introduction par mutagenèse dirigée de sites *Pst*I et *Bam*HI respectivement en amont et en aval du gène E7 et la seconde, M13TG8189 comporte un site *Pst*I en amont du gène E6. L'introduction de mutations ponctuelles en amont d'un ATG initiateur et en aval d'un codon stop sont à la portée de l'homme de l'art.

L'association de la protéine E7 de HPV-16 avec le produit du gène de rétinoblastome a été démontrée par divers auteurs (voir par exemple Munger et al., 1989, EMBO J. 8, 4099-4105) et corrélée à son pouvoir transformant. Pour des raisons évidentes de sécurité, on génère un mutant non oncogène délété des séquences codant pour les acides aminés 21 à 26 de la protéine E7 native impliqués dans la fonction de transformation par mutagenèse dirigée du vecteur M13TG8188 à l'aide de l'oligonucléotide oTG5118 (SEQ ID NO. 1). On obtient M13TG9104. Le gène E7 muté est désigné ci-après E7\*.

De même, il a été démontré que la protéine E6 de HPV-16 pouvait interagir avec le produit d'expression du gène suppresseur de tumeur *p53* (Crook et al.,

1991, Cell 67, 547-556). Le domaine impliqué dans cette interaction a clairement été défini et se situe entre les résidus 111 à 115 de la protéine native. Le vecteur M13TG9125 est généré par mutagénèse de M13TG8189 à l'aide de l'oligonucléotide oTG5377 (SEQ ID N°: 2). Le gène E6 muté est désigné ci-après E6\*.

*D. Construction du vecteur de transfert pTG5065 porteur des gènes E6 et E7 de HPV-16 et du gène de l'IL-2 humaine intégrés au locus K1L.*

Le fragment *EcoRI* K de 5,2 kb de l'extrémité gauche du génome du virus vaccine Copenhagen (Guillard et al., 1985, J. Virol. 53, 316-318) est cloné dans le plasmide pUC8 (Gibco BRL) linéarisé par *EcoRI*. Le vecteur ainsi obtenu est ensuite soumis à une digestion ménagée par *BglII* suivi d'une ligation afin de déléter un fragment de 855 pb codant pour le gène de restriction d'hôte K1L (Guillard et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 5573-5577). Le fragment *BglII* de 3,4 kb est isolé de cette construction intermédiaire désignée pUC8Khr puis cloné dans le site *BamHI* du plasmide pUC7 (Gibco BRL). On génère pBAC1 dans lequel on introduit un adaptateur *XhoI* à gauche du site *BglII* unique. Après digestion par *XhoI* et *BglII*, on insère un fragment *SalI*-*BglII* portant le promoteur vaccine p7,5K. Les deux sites *EcoRI* sont éliminés par digestion *EcoRI* suivi d'un traitement par la Klenow et d'une religation. Le vecteur pTG2147 est obtenu par introduction dans le site unique *BglII* d'un site multiple de clonage isolé du vecteur p poly II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) isolé sous forme d'un fragment *BglII*-*BamHI*. Il comprend donc les bras de recombinaison permettant l'insertion au locus K1L encadrant le promoteur p7,5K suivi des sites de restriction.

Les gènes E6\* et E7\* sont clonés en aval du promoteur vaccine pH5R contenu dans le vecteur M13TG9132, pour donner respectivement M13TG9138 et M13TG9139. A titre indicatif, le vecteur M13TG9132 provient de l'insertion du promoteur du gène H5R isolé par PCR du génome viral dans le phage M13TG6131.

Par ailleurs, l'ADNc codant pour l'interleukine-2 humaine est isolé du

plasmide pTG36 (brevet français 2 583 770), introduit dans un vecteur intermédiaire et resorti par digestion *Sall*-*Bam*HI pour être inséré dans le vecteur de transfert pTG2147 ciblant le locus K1L. L'insertion se fait au niveau des sites *Pst*I et *Xba*I situés en aval du promoteur p7,5K, à l'aide d'adaptateurs de clonage.

5 On obtient pTG5056.

Le bloc d'expression pH5R-E6\* est isolé du vecteur M13TG9139 sous forme d'un fragment *Bgl*II-*Bam*HI qui est introduit dans le site *Bam*HI du vecteur pTG5056. On génère le vecteur pTG5060. Le bloc d'expression pH5R-E7\* est purifié de M13TG9138 et inséré au site *Bam*HI du vecteur pTG5060, pour donner

10 pTG5062. On indique que l'insertion au locus K1L conduit à des virus recombinants ayant une capacité de réplication réduite voire même détruite dans certains types cellulaires. Pour ces raisons, on introduit un marqueur de sélection positive pour faciliter l'identification des virus recombinants. Le vecteur pTG5065 résulte du clonage dans le site *Bam*HI de pTG5062 d'une cassette d'expression

15 "pK1L-gène LacZ" isolée du plasmide pIV75 (Chen et al., 1993, *Virology* 196, 682-693) par clivage *Bgl*II- *Bam*HI. Comme visualisé à la Figure 2, il permet le transfert des blocs E6\*, E7\* et IL-2 au sein du locus K1L du virus de la vaccine

Le virus de la vaccine recombinant, dénommé VVTG5065, est généré par recombinaison homologue après transfection du vecteur pTG5065 dans les cellules

20 embryonnaires de poulet infectées par la vaccine Copenhague sauvage et repérées par coloration sous gélose au X-Gal. Les virus de la vaccine VVTG5021 et VVTG5065 sont utilisés dans des essais d'infections doubles. Les doubles recombinants sont sélectionnés selon les deux marqueurs : formation de plaques bleues en présence de X-Gal et délétion du marqueur TK. Ceux-ci, dénommés

25 VVTG5021&5065, expriment les blocs p7,5K-IL-2, pH5R-E6\* et pH5R-E7\* intégrés au locus K1L et les blocs p7,5K-L1 et p7,5K-L2 intégrés au locus TK.

L'expression des gènes de HPV peut être vérifiée par analyse en Western blot à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux appropriés ou par PCR

30 réverse. La production d'IL-2 peut être évaluée par test ELISA ou test CTL comme décrit dans la littérature. A titre indicatif, le niveau d'expression in vitro est de l'ordre de 60 ng/ml/10<sup>6</sup> cellules infectées à 1 pfu/cellule et 24h.



EXEMPLE 2: Construction d'un virus vaccine Copenhague exprimant les gènes E6, E7, et le gène IL-2 humain

L'ADNc codant pour l'interleukine-2 humaine est isolé du plasmide pTG36  
5 par digestion *Pst*I et inséré dans le site *Pst*I du plasmide pTG186, donnant lieu à pTG188. Le virus obtenu par recombinaison homologue est dénommé VVTG188.

Le gène E6\* est isolé de M13TG9125 sous forme d'un fragment *Pst*I-  
*Bam*HI et inséré en aval du promoteur 7,5K entre les sites *Pst*I et *Xba*I de  
pTG2147 en présence d'un adaptateur *Bam*HI-*Xba*I, donnant lieu à pTG5057. Le  
10 gène E7\* est placé sous le contrôle du promoteur vaccine H5R produisant M13TG9138 et la cassette bordée par les sites *Bam*HI-*Bgl*II est sous-clonée dans le site *Bam*HI de pTG5057. On obtient pTG5059, dans le site *Bam*HI duquel on insère le marqueur de sélection *LacZ* sous la dépendance du promoteur du gène vaccine K1L isolé par digestion *Bgl*II-*Bam*HI du vecteur pIV75. La construction  
15 résultante est désignée pTG5061 et le virus généré par recombinaison homologue avec le génome vaccine VVTG5061.

Un virus de la vaccine recombinant exprimant les gènes E6\* et E7\* intégrés  
au locus K1L et le gène de l'IL-2 humaine intégré au locus TK est obtenu par co-  
infection de cellules embryonnaires de poulet par les virus VVTG5061 et  
20 VVTG188. A titre indicatif, ce dernier produit environ une quantité d'IL-2 supérieure à 400 ng pour 10<sup>6</sup> cellules infectées à 1 pfu par cellule pendant 24h. Le virus doublement recombinant est désigné VVTG5061&188.

EXEMPLE 3: Construction d'un virus vaccine Copenhague exprimant les gènes E6, E7, et le gène codant pour le cofacteur d'adhésion B7.1 humain

L'ADNc codant pour B7.1 est isolé d'une préparation d'ARNm obtenue de  
la lignée cellulaire Daudi (ATCC CCL-213) par PCR reverse en utilisant les  
amorces oTG6353 et oTG6352 (SEQ ID N0: 3 et 4). On indique que la séquence  
30 du gène est divulguée dans Genbank sous le numéro d'accèsion M27533. Le fragment amplifié est cloné entre les sites *Bgl*II et *Eco*RI du M13TG6131

conduisant au M13TG9149 puis entre les sites *Bam*HI et *Eco*RI du pTG186. La construction est dénommée pTG5090 et le virus obtenu par recombinaison homologue VVTG5090. Un virus de la vaccine exprimant les gènes E6\* et E7\* de HPV-16 intégrés au locus K1L et le gène B7.1 humain intégré au locus TK peut être obtenu par co-infection de cellules embryonnaires de poulet par les virus VVTG5061 et VVTG5090. le virus recombinant est désigné VVTG5061&5090.

EXEMPLE 4: Construction d'un virus vaccine souche MVA exprimant les gènes E6, E7, et le gène B7.1 intégrés au sein de la zone d'excision III

10

Le virus MVA dérive de la souche du virus de la vaccine Ankara. Il n'est pas capable de générer des particules infectieuses sur les cellules de mammifères mais se développe correctement sur des fibroblastes embryonnaires de poulet. Son adaptation à ces cellules a provoqué l'excision de 6 régions non essentielles pour son développement et son cycle infectieux sur ce type de cellules (disparition d'environ 15 % du génome viral ; Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038). L'intégration de matériel génétique exogène peut être réalisé au niveau de l'une quelconque de ces zones d'excision. Dans le cadre de la présente invention, on utilise les excisions II et III localisées au niveau des fragments de restriction *Hind*III N et A respectivement (Altenburger et al., 1989, Arch. Virol. 105, 15-27)

Dans un premier temps, on construit le vecteur pTG6019 permettant l'insertion dans la zone d'excision III du virus MVA. Les bras de recombinaison homologue de part et d'autre de la zone d'excision III sont isolés par PCR à partir du génome viral (voir brevet américain US 5,185,146) et des amorces oTG7637 et oTG7638 (SEQ ID N°: 5 et 6) pour le bras gauche et oTG7635 et oTG7636 (SEQ ID N°: 7 et 8) pour le bras droit. Les fragments amplifiés sont clonés au site *Eco*RI du vecteur pTG1E, pour donner pTG6019. Le matériel génétique à transférer est inséré entre les deux bras de recombinaison. Le vecteur pTG1E est similaire au pTG1H (brevet français 2 583 429) mis à part la présence d'un adaptateur *Eco*RI à la place de sites multiples de clonage.

On insère en premier lieu une cassette d'expression du gène marqueur *gus*

- A. Le promoteur 7,5K est tout d'abord cloné dans le site *Bam*HI de pTG6019. On obtient pTG6021 dans le site *Bam*HI duquel on insère le gène *gus A* généré sous forme d'un fragment *Bgl*II-*Bam*HI. Celui-ci peut être obtenu à partir de la séquence divulguée dans la littérature. La construction résultante est dénommée pTG6022.
- 5 La présence du marqueur va permettre de discriminer les virus sauvages des virus recombinants par détection de l'activité enzymatique GUS par le substrat XglcA. Une coloration rouge révèle l'activité  $\beta$ -glucuronidase. Cependant, dans l'optique d'une application clinique, il peut être utile d'être en mesure d'éliminer ce marqueur bactérien du produit final après la sélection des virus recombinants. Pour ce faire,
- 10 on met à profit la capacité de la vaccine à déléter les séquences comprises entre deux sites homologues. C'est pourquoi on insère un second promoteur p7,5K en aval du gène *gus A* dans une orientation sens par rapport à celui qui dirige l'expression de ce dernier. Le vecteur pTG6022 est modifié par insertion entre les sites *Bam*HI et *Sac*I d'un fragment p7,5K muni d'extrémités cohésives, pour donner
- 15 pTG6025.

Celui-ci est complété par l'insertion des cassettes d'expression des gènes E6\* et E7\* mutées. On commence par introduire une nouvelle séquence promotrice p7,5K cette fois en orientation antisens par rapport aux précédentes. Cette construction dénommée pTG6039 comprend donc la cassette GUS labile

20 "p7,5K→*gus A*-p7,5K→" suivie de p7,5K dans l'orientation opposée. En parallèle, les gènes E6\* et E7\* sont isolés respectivement des vecteurs M13TG9104 et M13TG9125 par digestion *Bam*HI et *Pst*I et assemblés en orientation opposée l'un à l'autre au site *Pst*I de M13TG6131. L'ensemble est resorti sous forme d'un fragment *Pst*I qui est inséré dans pTG6039 linéarisé par cette même enzyme. On

25 obtient le vecteur pTG6056 qui contient les séquences suivantes p7,5K→*gus A*-p7,5K→E7\*-E6\*←p7,5K".

Le gène immunostimulateur B7.1 est intégré dans cette dernière construction. Pour ce faire, le vecteur pTG6056 est clivé par *Hind*III et *Kpn*I avant d'être mis en ligation en présence des oligonucléotides oTG10451 et oTG10450

30 (SEQ ID N0: 9 et 10), pour générer pTG6070. Ces derniers vont permettre le clonage de la cassette d'expression "pH5R-B7.1" par recombinaison homologue.

A cet effet, les séquences B7.1 isolées de M13TG9149 sont clonées en aval du promoteur vaccine pH5R, pour former M13TG9184. Le fragment *Bgl*II-*Eco*RI portant la cassette est intégré dans le vecteur pTG6070 linéarisé par *Xho*I par recombinaison homologue dans *E. coli*. On obtient le vecteur pTG6079 qui au total comporte le gène marqueur *gus A* sous une forme "labile" et les cassettes d'expression des gènes précoces de HPV-16 ainsi qu'une cassette du gène de costimulation B7.1. Le virus généré par recombinaison homologue avec le génome MVA est désigné MVATG6079.

Les blocs d'expression des gènes tardifs du HPV-16 peuvent être insérés au sein de la zone d'excision II à l'aide du vecteur de transfert pTG6018. Celui-ci est construit par insertion au site *Eco*RI de pTG1E des bras de recombinaison gauche et droit bordant l'excision II, générés par PCR en utilisant les amorces oTG7665 et oTG7584 (SEQ ID NO: 11 et 12) et oTG7639 et oTG7640 (SEQ ID NO 13 et 14). Comme précédemment, on intègre entre les deux bras une cassette d'expression d'un marqueur positif pour faciliter la détection des virus recombinants, celui-ci pouvant être éliminé après l'étape de sélection (Spehner et al., 1990, J. Virol. 64, 527-533). Le vecteur pTG6020 résulte du clonage du gène *LacZ* placé en aval du promoteur p7,5K dans le vecteur pTG6018 linéarisé par *Bam*HI. Le pTG6020 est modifié par l'insertion d'une séquence p7,5K entre ses sites *Bam*HI et *Sac*I situés en aval du gène *LacZ*. On obtient pTG6024. Les cassettes L1 et L2 peuvent ensuite être introduites selon une stratégie telle que montrée à la Figure 3.

EXEMPLE 5: Construction d'un virus vaccine souche MVA exprimant les gènes E6, E7, et le gène IL-2 intégrés au sein de la zone d'excision III

On utilise la même stratégie que précédemment pour introduire le gène IL-2 dans le vecteur pTG6056. Après clonage des oligonucléotides de recombinaison oTG10503 et oTG10502 (SEQ ID NO: 15 et 16) pour produire pTG6076, ce dernier est clivé par *Xho*I et le fragment *Bgl*II-*Eco*RI préparé à partir de M13TG9185 (pH5R-IL-2) inséré par recombinaison homologue. Le vecteur

pTG6090 ainsi obtenu comprend le gène marqueur *gus A* sous une forme "labile", les cassettes d'expression des gènes précoces de HPV-16 ainsi qu'une cassette du gène IL-2 humain. Le virus recombinant obtenu par recombinaison homologue avec le génome MVA est désigné MVATG6090. Les gènes tardifs peuvent être  
5 intégrés dans la zone d'excision II en mettant en oeuvre le pTG6018, comme indiqué ci-dessus.

EXEMPLE 6 : Validation du vecteur VVTG5021&5065 en modèle animal

10 A. Etudes de toxicité

Des souris nude ont reçu  $10^7$  pfu de VVTG5021&5065 ou  $10^7$  pfu de virus vaccine sauvage par voie intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée ou intracrâniale. Des lots de 5 souris sont constitués selon le type de virus injecté et  
15 la voie d'administration et on évalue 26 jours après l'injection, le nombre d'animaux présentant des lésions liées à la vaccine. Les souris ayant reçu le virus recombinant ne montrent aucune lésion quelles que soient la voie d'administration utilisée alors que la majorité des animaux traités avec la vaccine sauvage présente des lésions avec une fréquence et une gravité fonction de la voie d'administration. De plus, des  
20 décès sont enregistrés dans le cas d'une injection intraveineuse et intracrâniale. Ces données montrent que le VVTG5021&5065 est atténué par rapport au virus sauvage et qu'il n'entraîne pas de lésions même après une injection intracrâniale.

B. Expériences d'immunoprophylaxie avec le VVTG5021&5065

25

Des souris C57BL6 ont été vaccinées à trois reprises par voie sous-cutanée avec  $10^7$  pfu de VVTG5021&5065. Trois jours après la dernière immunisation, ces animaux sont éprouvés avec  $10^3$  cellules E7W1 implantées en sous-cutané. A titre indicatif, les cellules E7W1 proviennent d'une lignée de lymphome murin  
30 transfectée par un vecteur exprimant le gène E7 oncogène de HPV-16. Le pourcentage de survie des animaux en fonction du temps est comparé à celui

- 25 -

obtenu avec des souris témoins traitées avec  $10^7$  pfu d'un virus de la vaccine non recombinant VVTG186 (dérivé du vecteur TG186 décrit ci-dessus). Le suivi de la mortalité montre une différence entre les deux groupes. Dans le groupe témoin, 100 % des animaux sont morts à J36 alors que 40 % des animaux vaccinés par VVTG5021&5065 sont encore vivants à J36 et plus de 30 % à J51.

Ainsi les virus recombinants exprimant des antigènes de HPV et un gène immunostimulateur présentent une activité antitumorale à l'encontre des cellules tumorales exprimant l'oncogène E7 de HPV-16.

#### 10 C. *Expériences d'immunothérapie*

Des souris C57 BL6 sont inoculées avec  $10^3$  cellules E7 W1 implantées en sous-cutanée (J0).  $10^7$  pfu de virus recombinants, sont ensuite administrés également en sous-cutanée à J3 puis J6 et enfin J9 et le pourcentage de survie des animaux est déterminé par rapport aux animaux contrôles ayant reçu un virus non recombinant. Alors que 100 % des animaux contrôles sont morts, on observe un accroissement notable de la survie des animaux injectés avec un mélange de VVTG5061&5021 et de VVTG188. Des résultats similaires sont obtenus après administration de VVTG5065&5021 et VVTG188.

20 Ces expériences d'immunothérapie ont été reproduites en utilisant un modèle tumoral différent, des cellules BMK16 myc remplaçant les cellules E7w1. Les cellules BMK16myc sont des cellules de rein de souris nouveau-nées transfectées par le génome de HPV-16 et le gène c myc murin. Les animaux sont traités par  $10^7$  virus MVA TG6090 exprimant les gènes E6\*, E7\* de HPV-16 et l'IL-2 humaine. Par rapport aux contrôles, les souris traitées présentent un retard de la croissance tumorale jusqu'à J15.

- 26 -

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: TRANSGENE SA
- (B) RUE: 11 rue de Molsheim
- (C) VILLE: Strasbourg
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 67082
- (G) TELEPHONE: (33) 88 27 91 00
- (H) TELECOPIE: (33) 88 27 91 11

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Composition pharmaceutique contre les  
tumeurs  
et infections a papillomavirus

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 16

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Human papillomavirus
- (B) SOUCHE: HPV-16
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5118  
(E7 delete 21 a 26)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

- 27 -

TCTGAGCTGT CATTTAATTG AGTTGTCTCT GGTTC

36

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Human papillomavirus
- (B) SOUCHE: HPV-16
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG5377  
(E6 delete 111 a 115)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TGTCCAGATG TCTTTGCAGT GGCTTTTGAC AG

32

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG6353  
(PCR gene B7.1)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TCAGCCCCCTG AATTCTGCGG AACTGTAT ACAGG

35

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:



- 28 -

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG6352  
(PCR gene B7.1)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TTGACCCTAA AGATCTGAAG CCATGGGCCA CAC

33

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7637  
(PCR zone III)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGGGGGGAAT TCAGTAAACT TGACTAAATC TT

32

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple

- 29 -

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Vaccinia virus

(B) SOUCHE: Ankara modifiée

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7638  
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGGGGGGGAT CCGAGCTCAC CAGCCACCGA AAGAGCAAT

39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 32 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Vaccinia virus

(B) SOUCHE: Ankara modifiée

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7635  
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GGGGGGGGAT CCGGAAAGTT TTATAGGTAG TT

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 30 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- 30 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Vaccinia virus

(B) SOUCHE: Ankara modifiée

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7636  
(PCR zone III)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGGGGGGAAT TCTTTGTATT TACGTGAACG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 78 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10451

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CTTATACAGG GCGTACACTT TCCCTTCTCA ATCTCTCTCG AGTTGTATTT ATTTTCATTT

60

TTTAAGTATA GAATAAAA

78

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 86 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

- 31 -

## (vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10450

## (x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AGCTTTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAAATACAA CTCGAGAGAG ATTGAGAAGG 60

GAAAGTGTAC GCCCTGTATA AGGTAC 86

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7665  
(PCR zone II)

## (x1) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

ATGGTACCGA ATTCCATCTA CCAATTCATC CAACAACAT 39

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 41 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7584

- 32 -

(PCR zone II)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GGCTGCAGGA TCCGAGCTCA TCATGACGTC CTCTGCAATG G

41

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7639  
(PCR zone II)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GGGGGGGGAT CCTGTGAATC ATCCATTCCA CT

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA-SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Vaccinia virus
- (B) SOUCHE: Ankara modifiée
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG7640  
(PCR zone II)

- 33 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GGGGGGGAAT TCGTTACTAA ATTGCAAGGA AAT

33

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 69 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10503

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CTCAAGTCAG TGTTGAGATG ATGCTTTGAC AACTCGAGTT TATTTTCATT TTTTAAGTAT

60

AGAATAAAA

69

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 77 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese oTG10502

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

AGCTTTTTTAT TCTATACTTA AAAAATGAAA ATAACTCGA GTTGTCAAAG CATCATCTCA

60

ACACTGACTT GAGGTAC

77

Revendications

1. Composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus qui comprend à titre d'agents thérapeutiques :
  - (1) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus et au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus,
  - (2) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus, au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice, ou
  - (3) au moins un polypeptide originaire d'une région précoce ou tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice.
2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce que le polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus dérive de la protéine E6, de la protéine E7 ou des protéines E6 et E7 d'un papillomavirus.
3. Composition pharmaceutique selon la revendication 2, caractérisée en ce que le polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus est un variant non oncogène de la protéine E6 et/ou E7 d'un papillomavirus.
4. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus dérive de la protéine L1, de la protéine L2 ou des protéines L1 et L2.
5. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le polypeptide ayant une activité immunostimulatrice est sélectionné parmi le groupe constitué par l'interleukine-2, l'interleukine-7, l'interleukine-12

- 35 -

et les molécules de co-adhésion B7.1 et B7.2.

6. Composition pharmaceutique selon la revendication 5, caractérisée en ce que le polypeptide ayant une activité immunostimulatrice dérive de l'interleukine-2.

5

7. Composition pharmaceutique selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que le polypeptide ayant une activité immunostimulatrice dérive de la molécule B7.1.

- 10 8. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend :

(1) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1 et un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus,

15 (2) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,

(3) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de la molécule B7.1,

20

(4) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7 d'un papillomavirus, un polypeptide dérivé de la molécule B7.1 et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,

(5) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2,

25

(6) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus et un polypeptide dérivé de la molécule B7.1, ou

30



- 36 -

(7) un polypeptide originaire de la région E6, un polypeptide originaire de la région E7, un polypeptide originaire de la région L1, un polypeptide originaire de la région L2 d'un papillomavirus, un polypeptide dérivé de la molécule B7.1 et un polypeptide dérivé de l'interleukine-2.

9. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le papillomavirus est sélectionné parmi les types HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 et/ou HPV-45.

10

10. Composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus qui comprend à titre d'agent(s) thérapeutique(s) un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dans le(s)quel(s) sont insérés des fragments d'ADN codant pour :

15 (1) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus et au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus,

(2) au moins un polypeptide originaire de la région précoce d'un papillomavirus, au moins un polypeptide originaire de la région tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice, ou

20 (3) au moins un polypeptide originaire d'une région précoce ou tardive d'un papillomavirus et au moins un polypeptide ayant une activité immunostimulatrice ;

25 lesdits fragments d'ADN étant placés sous le contrôle des éléments nécessaires à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte.

11. Composition pharmaceutique selon la revendication 10, caractérisée en ce que lesdits polypeptides ont les caractéristiques définies aux revendications 2 à 9.

30

12 Composition pharmaceutique selon la revendication 10 ou 11, caractérisée en

- 37 -

ce que le vecteur recombinant est un vecteur viral dérivant du génome d'un virus sélectionné parmi les poxvirus, les adénovirus, les rétrovirus, les virus de l'herpès et les virus associés à l'adénovirus.

- 5 13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce que le vecteur recombinant dérive d'un poxvirus sélectionné parmi le groupe constitué par le virus de la vaccine, le canaripox et le fowlpox.
- 10 14. Composition pharmaceutique selon la revendication 13, caractérisée en ce que le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine sélectionné parmi les souches Copenhague, Wyeth et Ankara modifiée (MVA).
- 15 15. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 ou 14, caractérisée en ce que les éléments essentiels à l'expression des fragments d'ADN codant pour lesdits polypeptides comprennent un promoteur d'un gène d'un virus de la vaccine sélectionné parmi les promoteurs des gènes thymidine kinase (TK), 7,5K, H5R et K1L.
- 20 16. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague et que les fragments d'ADN codant pour lesdits polypeptides sont insérés dans le locus TK et/ou le locus K1L dudit virus de la vaccine.
- 25 17. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le vecteur recombinant dérive d'un virus de la vaccine de la souche MVA et que les fragments d'ADN codant pour lesdits polypeptides sont insérés au niveau de l'une quelconque des zones d'excision sélectionnées parmi les excisions I, II, III, IV, V et VI dudit virus de la vaccine.
- 30 18. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 17, destinée au traitement ou la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus

caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dérivé(s) d'un virus de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans le(s)quel(s) sont insérés :

- 5 (1) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- (2) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2,
- 10 (3) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1 et un fragment  
d'ADN codant pour l'interleukine-2,
- 15 (4) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un  
papillomavirus,
- 20 (5) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- 25 (6) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2, ou
- 30 (7) un fragment d'ADN codant pour la protéine E6 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine E7 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,

- 39 -

un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1 et un fragment  
d'ADN codant pour l'interleukine-2.

- 5 19. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 17, destinée à  
la prévention d'une infection ou tumeur à papillomavirus caractérisée en ce  
qu'elle comprend un ou plusieurs vecteur(s) recombinant(s) dérivé(s) d'un virus  
de la vaccine de la souche Copenhague ou MVA dans le(s)quel(s) sont insérés :
- 10 (1) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour la molécule B7.1,
- (2) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus  
et un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2, ou
- 15 (3) un fragment d'ADN codant pour la protéine L1 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour la protéine L2 d'un papillomavirus,  
un fragment d'ADN codant pour l'interleukine-2 et un fragment  
d'ADN codant pour la molécule B7.1.
- 20 20. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 19, caractérisée  
en ce que le vecteur recombinant est vivant ou tué.
21. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisée  
en ce qu'elle comporte un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique
- 25 permettant son administration par injection à l'homme ou à l'animal.
22. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 21, à titre de  
médicament pour le traitement ou la prévention du cancer du col de l'utérus,  
d'une dysplasie du col de bas grade et d'une infection à papillomavirus.